# Untersuchungen zur Strukturermittelung eines IgA-Immunglobulins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität in Göttingen

vorgelegt von
Peter Altevogt
aus Osnabrück

Göttingen 1976

# Untersuchungen zur Strukturermittelung eines IgA-Immunglobulins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität in Göttingen

vorgelegt von
Peter Altevogt
aus Osnabrück

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. G. Spiteller

Korreferent: Professor Dr. U. Schöllkopf

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 7. 1976

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Immunchemie unter Anleitung von Prof.N.Hilschmann in der Zeit von Mai 1973 bis Februar 1976 ausgeführt.

Herrn Prof.N.Hilschmann danke ich für die Stellung des Themas und für seine wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof.G.Spiteller danke ich für die Übernahme des Referates.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0022

INHALTSVERZEICHNIS


| | Seite |
|---|---|
| A EINLEITUNG | 1 |
| B MATERIAL UND METHODEN | 6 |
| 1. Ausgangsmaterial | 6 |
| 2. Experimentelle Methoden | 7 |
| 2.1. Reinigung und Charakterisierung der H-Kette | 7 |
| 2.1.1. Gelfiltration an Sephadex G 100 | 7 |
| 2.1.2. Polyacrylamid-Diskelektrophorese als Reinheitskriterium und zur MG-Bestimmung | 7 |
| 2.2. Reduktion und Carboxymetnylierung | 8 |
| 2.3. Aminoäthylierung | 8 |
| 2.4. Spaltung mit α-Chymotrypsin | 9 |
| 2.5. Isolierung der chymotryptischen Peptide | 9 |
| 2.5.1. Fraktionierung der chymotryptischen Spaltprodukte an Dowex 1X2 | 9 |
| 2.5.2. Rechromatographien | 10 |
| 2.5.2.1. Rechromatographie über Dowex 50X2 | 11 |
| 2.5.2.2. Rechromatographie über Dowex 1X2 | 11 |
| 2.5.2.3. Rechromatographie über phosphorylierte Cellulose | 12 |
| 2.5.3. Reinigung über Sephadex | 13 |
| 2.5.4. Bestimmung der $H^3$-Aktivität | 13 |
| 2.5.5. Peptidisolierung durch präparative Papierchromatographie | 14 |
| 2.5.6. Reinheitsprüfung der Peptide | 14 |
| 2.5.6.1. Analytische Papierchromatographie | 14 |
| 2.5.6.2. Papierelektrophorese | 15 |
| 2.5.6.3. Sprühtests zum Peptidnachweis | 15 |
| 2.5.6.4. Aminosäureanalysen | 15 |
| 2.6. Sequenzermittlung | 16 |
| 2.6.1. Dansyl-Endgruppen-Bestimmung | 16 |

2.6.2. Dansyl-Edman-Abbau 17
2.6.3. Edman-Abbau mit Nachweis der Phenylthiohydantoine 18
2.7. Bestimmung des C-Terminus 18
2.7.1. Spaltung mit Carboxypeptidase A 18
2.7.2. Spaltung mit Carboxypeptidase B 19
2.7.3. Hydrazinolyse 19
2.8. Enzymatische Peptidhydrolyse mit Aminopeptidase M 20
2.9. Nachspaltung mit Trypsin 20
2.10. Nomenklatur 21
C ERGEBNISSE 23
1. Reinigung und Charakterisierung der H-Kette 23
2. Spaltung der carboxymethylierten H-Kette mit Chymotrypsin und Isolierung der Peptide 27
3. Die Aufstellung der Primärstruktur 42
3.1. Die tryptischen Peptide 42
3.2. Zuordnung der tryptischen Peptide durch chymotryptische Überlappungspeptide 44
4. Die vollständige Aminosäuresequenz der H-Kette TRO 66
D DISKUSSION 69
1. Kettenvergleich der α-Kette TRO mit anderen H-Ketten 69
1.1. Der variable Teil 69
1.2. Genetische Interpretation der Variabilität 76
1.3. Der konstante Kettenabschnitt 78
1.4. Genetische Interpretation des konstanten Kettenabschnittes 80
2. Antikörperproblem und Differenzierung 84
Zusammenfassung 88
E LITERATURVERZEICHNIS 89

## A. Einleitung

Die Fähigkeit eines Organismus zur spezifischen Immunantwort stellt eine Errungenschaft dar, die erst auf der Stufe der Wirbeltiere einsetzt (1).

Träger der sogenannten humoralen Immunität sind eine Klasse von Serumproteinen, die Antikörper. Diese von Plasmazellen des Organismus erzeugten Proteine sind streng spezifisch gegen das ihre Bildung veranlassende Antigen gerichtet (2).

Nach Untersuchungen von FLEISCHMAN et.al. (3) und EDELMAN et.al. (4) bestehen Immunglobuline aus jeweils zwei identischen schweren (H)- und leichten (L)-Ketten, die in der Regel über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. L-Ketten lassen sich in $\kappa$- und $\lambda$-Ketten unterscheiden, H-Ketten in solche vom $\gamma$- ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$), $\mu$-, $\alpha$- ($\alpha_1, \alpha_2$) oder $\varepsilon$-Typ (5).
Ein wichtiges Strukturmerkmal aller Ketten ist ihre Zweiteilung in einen variablen (V)- und einen konstanten (C)-Teil. Diese Zweiteilung wurde erstmals von HILSCHMANN und CRAIG (6) beim Vergleich der Primärstrukturen zweier $\kappa$-Ketten festgestellt.

Da Antikörper durch eine außerordentliche Heterogenität gekennzeichnet sind, können Sequenzuntersuchungen an durch Immunisierung gewonnenen Antikörpern nicht vorgenommen werden (7). Ausgangsmaterial für derartige Untersuchungen sind daher von Plasmazelltumoren gebildete, sogenannte Myelomproteine, die in der Regel monoklonal, d.h. gleichzeitig chemisch einheitlich sind (8).

Die Heterogenität der Immunglobuline steht in engem Zu-

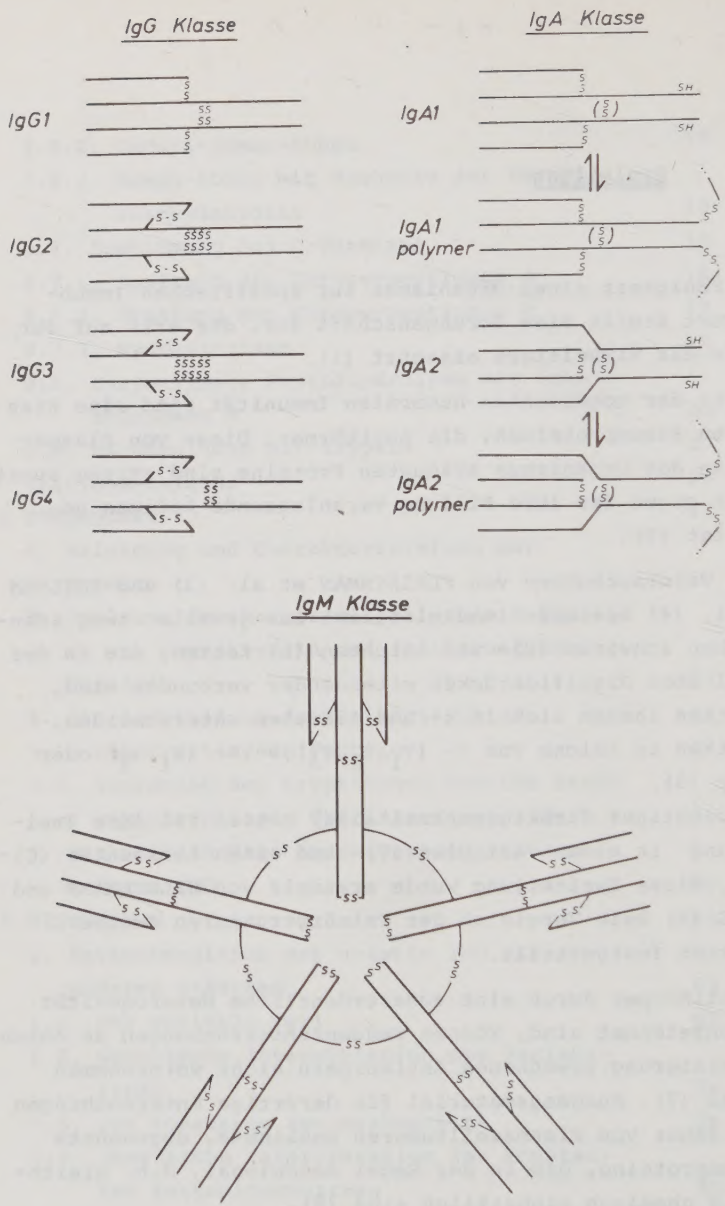



Abb. 1 Übersicht über die Grundstruktur der Immunglobulin-Klassen IgG, IgM, IgA.

sammenhang mit der Spezifität. Außerdem ist sie Ausdruck eines Polymorphismus, wie er auch von anderen Proteinen her bekannt ist (5).

Die Spezifität beschränkt sich nur auf die jeweiligen V-Teile der Immunglobulin-Ketten. Dieser Bereich umfaßt etwa 110 Aminosäuren des N-terminalen Endes einer jeden Kette (5). Er ist durch eine hohe Austauschrate der Aminosäuren gekennzeichnet. Diese Tatsache wurde erstmals nach Strukturuntersuchungen an mehreren isolierten L-Ketten vom κ- und λ-Typ festgestellt (6). Sie ist aber auch auf H-Ketten übertragbar (9).

Die V-Teile der Ketten eines Typs lassen sich je nach Ähnlichkeiten ihrer Aminosäuresequenz in sogenannte Subgruppen einordnen.

Der Polymorphismus der Antikörper kommt durch die verschiedenen Kettentypen zustande. Diese werden in erster Linie durch den konstanten Teil einer Kette bestimmt. Der konstante Teil ist bei den L-Ketten gleichlang wie der V-Teil, bei den H-Ketten besitzt er ein Vielfaches dieser Länge.
Der Typ der H-Kette legt die Zugehörigkeit des Antikörpers zu einer Immunglobulinklasse fest, z.B. IgG, IgM,IgA,IgE. Abb. 1 gibt einen Überblick über die bisher bekannten bzw.vermuteten Grundstrukturen einiger Immunglobulinklassen. Die bisher bekannten Primärstrukturen umfassen zwei IgG-Moleküle (9 - 11), eine ε-Kette (12) und die von WATANABE et.al. 1973 publizierte Struktur eines IgM-Moleküls (13). Von einigen weiteren H-Ketten sind die V-Teile bekannt (14).

1975 wurde von uns in Kurzform die erste vollständige Sequenz eines IgA-Immunglobulins veröffentlicht (15). Das Protein ist der erste bekannte Vertreter aus einer der drei am häufigsten im Serum vorkommenden Immunglobulinklassen. Über seine Struktur waren bis zu

diesem Zeitpunkt nur wenige Teilsequenzen um die Cystein-Reste der H-Kette bekannt, die nach tryptischer, bzw. tryptisch-peptischer Spaltung isoliert wurden (16-20). 1976 konnte die von uns für die α-Kette vorgestellte Struktur von PUTNAM et.al.(21), der den C-terminalen Teil einer -Kette untersuchte, bestätigt werden.

Es handelt sich beim IgA um ein Protein, das im normalen Humanserum in einer Konzentration von 150-250mg% enthalten ist. Außerdem kommt es als sekretorisches Immunglobulin in einigen Körpersekreten sowohl frei als auch in Verbindung mit einem bisher unbekannten Protein, der Sekretkomponente, vor (22). IgA-Immunglobulin besitzt die Eigenschaft, in verschiedenen Molekulargewichten aufzutreten. Diese verschiedenen Molekulargewichte lassen sich Aggregationsformen zuordnen, die vom polymeren - bis hin zum monomeren IgA reichen (23). In Verbindung mit polymerem IgA tritt ein weiteres unbekanntes Protein, die J-Kette, auf (24). Dem monomeren IgA, das hauptsächlich im Serum vorkommt, wird ein Molekulargewicht von 160000 zugeschrieben (25).

Für den Vergleich zwischen den Ketten der verschiedenen Klassen ist die vorliegende Primärstruktur eines IgA-Immunglobulins und die Sequenz seiner H-Kette von besonderem Interesse. Die strukturellen Daten der C-Teile dieser Ketten liefern wichtige Erkenntnisse über die Entstehung des Polymorphismus dieser Proteinklasse, während die V-Teil-Sequenzen zum Verständnis der Spezifität beitragen.

Die hier vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Strukturaufklärung eines IgA-Immunglobulins dar. Sie beschäftigt sich mit den nach Spaltung der α-Kette durch Chymotrypsin erhaltenen Peptiden und ist gegliedert in die Isolierung, Reinigung und Sequenzermittlung der

chymotryptischen Bruchstücke, die Aufstellung der Primärstruktur unter Mithilfe von tryptischen Peptiden (26) und Bromcyan-Fragmenten (27) und in eine Diskussion der Sequenzdaten der α-Kette auf dem Hintergrund der bisherigen Vorstellungen zur Genetik der Antikörper.

## B. Material und Methoden

### 1. Ausgangsmaterial

IgA ist im Serum des Myelompatienten Troude (TRO) in einer Konzentration von 3 g% vorhanden.

Nach Abtrennung der Lipoproteine durch Zentrifugation und Entfibrinisierung mit 2.5 molarer $CaCl_2$-Lösung kann das Serum entweder durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung oder durch Pevikon-Blockelektrophorese bei pH 8.6 von Serumalbumin, IgG und anderen Serumproteinen getrennt werden.

Das so bereits gut vorgereinigte IgA läßt sich über eine Sephadex G 200-Säule in 0.1 N Tris/HCl-Puffer, 0.2 N NaCl in mehrere Gipfel trennen, die den verschiedenen Aggregationsstufen des Moleküls entsprechen (27). Eine im Säulenausschlußvolumen eluierte, dem polymeren IgA entsprechende und eine chromatographierte monomere Fraktion sind leicht isolierbar (27).

Das gereinigte Material ist mit immunologischen Methoden auf seine Einheitlichkeit hin untersucht. Das Protein entspricht serologisch dem IgA 1-Typ.

Monomeres IgA besitzt noch eine geringe Verunreinigung an IgG, ( ca.6% ), polymeres IgA dagegen enthält etwa 5% Serumalbumin (27).

Zur Bearbeitung der chymotryptischen Peptide der α-Kette TRO wurde ausschließlich monomeres IgA verwandt.

# 2. Experimentelle Methoden

## 2.1. Reinigung und Charakterisierung der H-Kette

### 2.1.1 Gelfiltration an Sephadex G 100

Die Trennung der H- und L-Ketten aus monomerem IgA TRO erfolgte an Sephadex G 100 (Perlform 40-120 µm, Firma Pharmacia, Upsalla) in einer 6.2x148 cm-Säule. Als Fließmittel diente 0.1 N Tris/HCl-Puffer, pH 8.0, mit einem Zusatz von 6 M Harnstoff. 700 mg der in 50 ml des genannten Puffers gelösten, total reduzierten H- und L-Ketten wurden auf die Säule gegeben. Die Trennung erfolgte unter hydrostatischem Druck mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h. Das Eluat wurde in 10 ml-Fraktionen gesammelt und die Extinktion jedes Röhrchens im Spektralphotometer (PMQ III, Fa.Zeiss, Oberkochem) bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen unter den Gipfeln wurden zur Konzentrierung druckdialysiert (Kollodiumhülsen Fa. Sartorius, SM 13200, Göttingen).

### 2.1.2. Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese als Reinheitskriterium und zur MG-Bestimmung

Verwendung fand ein 10.5%iges Polyacrylamidgel mit einem pH von 8.9 im Trenngel. Die Polymerisation mit Ammoniumperoxydisulfat (0.2%ige Lösung) erfolgte in Glasröhrchen mit 3 mm Innendurchmesser und 90 mm Länge. Elektrodenpufferlösung (Tris-Glycin-Puffer pH 8.3) und Trenngelpuffer enthielten 0.1% Na-Dodecylsulfat (SDS, Fa. Biomol, Ilvesheim), der Elektrodenpuffer zusätzlich 0.1% 2-Mercaptoäthanol (Fluka AG, Buchs SG). Bei einer Spannung von 40 V (0.5 mA pro Gel) wurde 6-8 h getrennt. Die Färbung der Gele erfolgte in 0.25%iger Coomasie brillant blue-Lösung. Die aufzutragenden Proben und Testgemische waren in 0.1% SDS gelöst und wurden vorher mit 1% 2-Mercapto-

äthanol reduziert. Eine ausführliche Beschreibung des Gelsystems findet sich an anderer Stelle (28).

## 2.2. Reduktion und Carboxymethylierung (29)

3.5 g monomeres IgA TRO wurden in 250 ml 0,1 Tris/HCl-Puffer pH 8,0 in Gegenwart von 6M Harnstoff gelöst. Nach Zugabe von 3.9 g (0.1 molar) DTT (Dithiothreitol, Biomol, Fa.E.Barth, Ilvesheim) zur vollständigen Reduktion wurde der Ansatz eine Stunde lang gerührt. Zur Carboxymethylierung wurden der Reaktionsmischung zunächst 1 mCi $H^3$-markierter Jodessigsäure (spezifische Aktivität 64 mCi/mmol, Fa.Amersham Buchler, Braunschweig) zugesetzt. Nach weiteren 10 min folgten 14 g (0.3 molar) unmarkierter Jodessigsäure (Fluka AG, Buchs SG) zur Alkylierung der restlichen freien SH-Gruppen. Der Ansatz wurde noch weitere 2 h gerührt, anschließend H- und L-Ketten wie bereits beschrieben getrennt.

## 2.3. Aminoäthylierung (30)

1.2 g der durch partielle Reduktion mit 0.01 molar DTT aus IgA TRO gewonnenen H-Kette wurden in 200 ml 0.1 N Tris/HCl-Puffer pH 8.0, 6 M Harstoff, gelöst. Nach Zugabe des DTT (0.1 molar) wurde eine Stunde bei 37°C gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Äthylenimin (Fa.Fluka AG, Buchs SG) in drei Portionen (3x1 ml alle 10 min) bis zu einer Endkonzentration der Lösung von 0.3 molar. Nach weiterem Rühren (2h) wurde der pH mit Eisessig auf 8.5 eingestellt und die Lösung anschließend druckdialysiert.

## 2.4. Spaltung mit α-Chymotrypsin

1.9 g der carboxymethylierten H-Kette wurden in 150 ml Wasser gelöst, mit 30 mg α-Chymotrypsin (3x kristallisiert, Fa. Worthington, Freehold, USA) bei pH 8.2 und 37 °C unter Stickstoff gespalten. Der pH der Reaktionslösung wurde mit einem Autotitrator (SBR 2/TTT1/ABU 1, Fa. Radiometer, Kopenhagen ) mit 0.25 N NaOH konstant gehalten. Nach 5 h erfolgte keine NaOH-Aufnahme mehr. Der pH der Lösung wurde auf 9.5 eingestellt und das gesamte Hydrolysat, einschließlich des im Verlauf der Spaltung entstandenen schwerlöslichen Niederschlages, zur Trennung auf die Ionenaustauschersäule gebracht.

## 2.5. Isolierung der chymotryptischen Peptide

### 2.5.1. Fraktionierung der chymotryptischen Spaltprodukte an Dowex 1X2

Das Harz (200-400 mesh, Reinheitsgrad pract., Serva, Heidelberg) wurde in seiner Acetatform in eine auf 37 °C temperierte 2x150 cm-Säule eingefüllt und mit 4 l Startpuffer (Komp. 1) äquilibriert. Anschließend wurde das chymotryptische Hydrolysat aufgetragen und mit Stickstoff in das Harz gedrückt. Zur Eluation der Spaltprodukte fand ein logarithmisches Gradientensystem (1 l-Mischgefäß) Verwendung. Spartpuffer war eine wässrige Lösung von 1% Pyridin, 1% 2-Picolin und 1% 2,4-Lutidin, die mit Eisessig auf pH 8.5 eingestellt war (6).

Die durch Pumpendruck erzeugte Eluationsgeschwindigkeit betrug 60 ml/h. Zur Erzeugung des Gradienten wurden die in der Tabelle 1 angegebenen Puffer zugeführt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 10 ml gesammelt und der pH-Wert jeder 10. Fraktion gemessen. Mit 40 µl je-

der Fraktion wurden nach alkalischer Hydrolyse eine Ninhydrinreaktion (31) durchgeführt und dann bei 570 nm im Filterphotometer (Elko III, Fa. Zeiss, Oberkochem) gemessen.

| Komp. | Puffer | Fraktion |
|---|---|---|
| 1 | 1% Pyridin, 1% Picolin, 1% 2,4-Lutidin mit Eisessig auf pH 8.5 eingestellt. | 1- 30 |
| 2 | dto. mit Eisessig auf pH 7.5 eingestellt | 31- 80 |
| 3 | 0.1 N Essigsäure, | 81-180 |
| 4 | 0.2 N Essigsäure | 181-300 |
| 5 | 0.5 N Essigsäure | 301-470 |
| 6 | Eisessig | ab 471 |

Tab.: 1

Die einzelnen Fraktionen wurden zusammengefaßt, getrocknet, in 5 ml Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur vorläufigen Charakterisierung der Fraktionen wurden Papierchromatogramme angefertigt.

### 2.5.2. Rechromatorgaphien

Zur weiteren Reinigung wurde jede Fraktion einer erneuten Chromatographie unterworfen. Die Fraktionen 1-14 wurden über Dowex 50X2, die Fraktionen ab 15 erneut an Dowex 1X2 getrennt. Die Rechromatographien erfolgten bei 37 °C in 28x1 cm-Säulen, in die das jeweilige Harz ca 25 cm hoch eingefüllt wurde. Die Eluation erfolgte generell unter Pumpendruck mit einer Geschwindigkeit

von 5ml/10 min. Das Eluat wurde in 5 ml-Fraktionen gesammelt, von denen jeweils 75-150 µl zur Ninhydrinreaktion eingesetzt wurden. Alle verwendeten Puffer enthielten einen Zusatz von 30 Vol% n-Propanol.

2.5.2.1. Rechromatographie über Dowex 50X2

Das in seiner $H^+$-Form vorliegende Harz (200-400 mesh, Reinheitsgrad pract., Serva Heidelberg) wurde mit Startpuffer 1 (Tab. 2) äquilibriert und vor dem Auftragen des Peptides mit 10 ml 50%iger Ameisensäure gespült. Das Peptid wurde in 50 %iger Ameisensäure gelöst aufgetragen.

| Eluationsmittel | Puffer | Fraktionen |
|---|---|---|
| 1 | 0.05 N Pyridiniumformiat pH 2.3, 30% n-Propanol | 1- 10 |
| 2 | linearer Gradient aus je 400 ml Eluationspuffer 1 und 400 ml 2 N Pyridiniumacetat pH 5.3, 30% n-Propanol | 11-130 |
| 3 | 0.2 N NaOH | ab 131 |

Tab.: 2

2.5.2.2. Rechromatographie über Dowex 1X2

Die Durchführung erfolgte analog zu dem bereits beschriebenen Verfahren. Der Gradient wurde hier jedoch in einem 250 ml-Erlenmeyer-Kolben erzeugt.
Tab. 3 gibt die eingeleiteten Pufferlösungen wieder.

Die Probe wurde mit 0.2 N NaOH auf pH 9.5 eingestellt und dann auf die mit Puffer 1 äquilibrierte Säule gegeben.

| Eluations-mittel | Puffer | Fraktionen |
|---|---|---|
| 1 | 1%Pyridin, 1% 2-Picolin, 1% 2,4-Lutidin in 30 Vol% n-Propanol,in Wasser mit HAc auf pH 8.5 eingestellt. | 1- 15 |
| 2 | wie 1, auf pH 7.5 eingestellt | 16- 30 |
| 3 | 0.1 N Essigsäure in 30 Vol% n-Propanol | 31- 45 |
| 4 | 0.2 N Essigsäure in 30 Vol% n-Propanol | 46- 55 |
| 5 | 0.5 N Essigsäure in 30 Vol% n-Propanol | 56-125 |
| 6 | Eisessig, bis der pH des Eluats unter 1 sinkt | ab 126 |

Tab.: 3

2.5.2.3. Rechromatographie über phosphorylierte Cellulose

Die nach Vorschrift (32) gewaschene phosphorylierte Cellulose (P11, Fa.Whatman, Maidstone) wurde in 1 x 30 cm-Säulen gefüllt und mit Startpuffer 1 (Tab.4) äquilibriert. Die in 10 ml dieses Puffers gelöste und mit Ameisensäure auf pH 2.0 eingestellte Probe wurde auf die Säule gegeben und unter hydrostatischem Druck bei Raumtemperatur nach dem in Tab.4 angegebenen Schema eluiert.

Gesammelt wurden 5 ml-Fraktionen mittels Tropfenzählers.

| Eluations-mittel | Puffer | Fraktionen |
|---|---|---|
| 1 | 0.1 N Pyridiniumformiat pH 3.0 | 1- 20 |
| 2 | linearer Gradient erzeugt in einem Zweikammergefäß aus 400 ml (1) und 400 ml 2,0 N Pyridiniumformiat pH 4.5 | 21-120 |
| 3 | 6 N Pyridiniumacetat pH 7.0 | 121-140 |
| 4 | 0.2 N NaOH + 1 N NaCl | ab 141 |

Tab.: 4

### 2.5.3. Reinigung über Sephadex

Für routinemäßige Entsalzungen von Proben fanden 1.3 x 150 cm-Säulen mit Sephadex G 25 (Fa.Pharmacia, Upsalla) in 35%iger Ameisensäure oder 0.8%igem Ammoniak Verwendung. Chromatographiert wurde unter hydrostatischem Druck bei Fließgeschwindigkeiten zwischen 10-40 ml/h. Mit Hilfe eines Tropfenzählers wurden Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Extinktion des Eluats wurde kontinuierlich in einem Uvicord II (280 nm) bzw. Uvicord III (208 nm) (Fa. LKB Producter, Bromma, Schweden) gemessen und automatisch registriert. Die Trennung der großen chymotryptischen Bruchstücke an Sephadex G 75 bzw. G 50 (Säulen 1.3x200 cm ) wurden in prinzipiell gleicher Weise durchgeführt.

### 2.5.4. Bestimmung der $H^3$-Aktivität

Zur Lokalisation von Cystein-Peptiden wurden in der Regel im Anschluß an säulenchromatographische Trennungen

eine Radioaktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Die $H^3$-Aktivität wurde in einem Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3320 der Fa.Packard (Illinois, USA) bestimmt. Die eingesetzten Probemengen betrugen 50-150 µl jeder Fraktion. Als Scintillationsflüssigkeit diente Unisolve I (Koch Light Lab., Colnbrook, Bucks, England) und als Zählröhrchen wurden die der Fa.Packard (Illinois, USA) verwendet. Die Zähldauer pro Fraktion lag zwischen einer und fünf Minuten.

### 2.5.5. Peptidisolierung durch präparative Papierchromatographie

Auf Chromatogrammpapier 2043 b Mgl (Fa.Schleicher und Schüll, Dassel) wurden ca. 0.5-3 µMol Peptidgemisch gelöst in 500 µl Wasser in kleinen Portionen zu einem 10 cm breiten Streifen aufgetragen und getrocknet. Danach wurde das Papier eine Stunde mit der wässrigen Phase des Systems n-Butanol/Eisessig/$H_2O$, 4:1:5 (v/v/v) (33) äquilibriert. Das Chromatogramm wurde 24 h mit der organischen Phase absteigend entwickelt. Die Lokalisation der getrennten Peptide erfolgte an Referenzstreifen, die mit Ninhydrinreagenz gesprüht wurden. Die Eluation der Peptide von den Papierstreifen erfolgte mit 0.5 N Essigsäure oder mit 0.8%igem Ammoniak.

### 2.5.6. Reinheitsprüfung der Peptide

#### 2.5.6.1. Analytische Papierchromatographie

Papierchromatogramme wurden punktförmig auf Papier 2043 b Mgl (Schleicher und Schüll, Dassel) aufgetragen, und absteigend mit der organischen Phase des oben genannten Systems entwickelt. Zuvor wurde das Papier

mit den Dämpfen der wässrigen Phase äquilibriert. Die Wanderungsstrecke der Peptide im Verhältnis zu der des Leucins wird als $R_{Leu}$-Wert angegeben.

2.5.6.2. Papierelektrophorese

Verwendet wurde eine Kühlblock-Apparatur der Fa.Hölzl, Dorfen. Die Proben wurden auf das bereits oben genannte Papier punktförmig aufgetragen und die Elektrophorese bei 4 °C, 1500 V, 90 min lang ausgeführt. Zur Amidbestimmung wurde ein 5%iger Pyridiniumacetat-Puffer, pH 6.5 und für Histidin-Peptide ein Pyridiniumacetat-Puffer, pH 7.8 verwendet.
Die unter diesen Bedingungen ermittelte Mobilität wird als $R_{Lys}$-Wert ausgedrückt.

2.5.6.3. Sprühtests zum Peptidnachweis auf Papier

Peptidnachweise erfolgten mit Ninhydrinreagenz (34). In der Regel wurden parallel dazu Chromatogramme mit Reagenzien spezifisch für den Nachweis von Tyrosin (35), Arginin (36), Histidin (37), Tryptophan (38) und schwefelhaltige Aminosäuren (39) gefärbt.

In einigen Fällen wurden Peptide mit blockiertem N-Terminus mit Jod/Stärke nach vorheriger Chlorierung nachgewiesen (40).

2.5.6.4. Aminosäureanalysen

In der Regel wurden 0.01 - 0.03 µMol getrocknetes Peptid mit 4 ml 6N HCl bei110 °C 24 h lang unter Vakuum hydrolysiert. Bei Tyrosin-haltigen Peptiden

wurden 50 µl einer 2.5%igen wässrigen Phenollösung zugesetzt. Einige Tryptophan-Peptide wurden in Gegenwart von 2% Thioglykolsäure (41), Cystein-Peptide mit 0.1% 2-Mercaptoäthanol-Zusatz (42) hydrolysiert. Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Proben getrocknet und die Zusammensetzung im automatischen Aminosäureanalysator bestimmt. Die Hydrolysenverluste an Threonin und Serin sind durch die Faktoren 1.05 und 1.11 korrigiert.

## 2.6. Sequenzermittlung

### 2.6.1. Dansyl-Endgruppen-Bestimmung (43)

5-10 nmol Peptid wurden mit 10 µl einer 0.25%igen Lösung von Dansylchlorid (1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfochlorid, Fa.Fluka, Buchs SG) in Aceton 1h bei pH 9.6 und 37°C inkubiert. Nach Trocknen der Probe folgte eine Hydrolyse mit 6 N HCl (50 µl) für 18 h bei 110 °C. Für Serin und Prolin betrug die Hydrolysendauer nur 6 h. Das Hydrolysat wurde erneut getrocknet, in einer Mischung aus Aceton und Eisessig (3:3, v/v) aufgenommen und auf Polyamiddünnschichtfolien (44) (DC-Fertigfolien F1700 Mikropolyamid, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetragen. Auf der Rückseite der Folie wurde zusätzlich ein Referenzgemisch (Dansyl-Aminosäuren der Fa. British Drug Houses, Ltd. Poole) aufgetragen. Anschließend erfolgte eine zweidimensionale aufsteigende Chromatographie. In der ersten Richtung wurde mit dem System Wasser/90%ige Ameisensäure 200:3 (v/v) getrennt, in der 2.Richtung (Drehung der Platte um 90°) nach Lufttrocknung mit

Benzol/Eisessig 9:1. Dansyl-Asparaginsäure und Dansyl-Glutaminsäure wurden durch eine dritte Chromatographie in der 2.Richtung mit Essigsäureäthylester/Methanol/Eisessig 20:1:1, (v/v/v) getrennt. Cystein- und Methionin-haltige Aminosäuren wurden stets unter Stickstoff hydrolysiert, um eine Zersetzung der Dansyl-Aminosäuren zu vermeiden. Dansyl-Tryptophan konnte nur an Peptiden nachgewiesen werden, bei denen diese Aminosäure C-terminal stand.

### 2.6.2. Dansyl-Edman-Abbau

In Abhängigkeit von der Peptidlänge und der Anzahl der abzubauenden Schritte wurden 30-150 nmol Peptid im Exikkator getrocknet, in 150 µl Wasser aufgenommen und nach Entnahme von 10 µl Probe für die Dansyl-Endgruppen-Bestimmung (siehe 2.6.1.) mit 150 µl einer 5%igen Lösung von Phenylisothiocyanat (Fa.Schuchard, München) in Pyridin versetzt. Die Probenröhrchen wurden mit Stickstoff durchgeblasen und dann 1.5 h bei 45 °C inkubiert. Nach der erfolgten Anlagerung des Senföls wurde die Probe über Schwefelsäure im Exikkator getrocknet. Die Probe wurde in 200 µl Trifluoressigsäure (Fa.Merck,Darmstadt) aufgenommen und erneut für 30 min bei 45 °C inkubiert. Der Rückstand der getrockneten Probe wurde in 200 µl Wasser gelöst bzw. suspensiert und das Phenylthiohydantoin zweimal mit 0.5 ml Essigsäurebutylester (Fa.Merck,Darmstadt) extrahiert. Das in der wässrigen Phase verbliebene Restpeptid wurde wiederum getrocknet und für einen neuen Reaktionszyklus eingesetzt.

### 2.6.3. Edman-Abbau mit Nachweis der Phenylthiohydantoine

Zum Abbau der N-terminalen Aminosäuren wurden ca.150 nmol/abzubauenden Schritt des Peptides nach BLOMBÄCK et.al.(45) mit Phenylsenföl umgesetzt. Das mit Trifluoressigsäure vom Restpeptid abgespaltene Thiazolidon wurde durch Inkubation mit 1 N HCl bei 80 °C in das Phenylthiohydantoin umgewandelt. Die Identifizierung der Phenylthiohydantoine erfolgte auf Kieselgel-Dünnschichtplatten mit Fluoreszensindikator (DC-Fertigplatten Merck, Kieselgel $F_{254}$), die mit den Fließmittelsystemen von EDMAN und SJÖQUIST (46), BRENNER et.al.(47) und DOOLITTLE (48) entwickelt wurden.

## 2.7. Bestimmung des C-Terminus

Durch Spaltung mit Carboxypeptidase A und B wurden die C-terminalen Aminosäuren der Peptide ermittelt (49).

### 2.7.1. Spaltung mit C'ase A

Verwendet wurde Carboxypeptidase A-DFP (1000 U/ml, Fa.Sigma St.Louis, USA) aus Rinderpankreas, die im Verhältnis 1:100 (v/v) in 0.05 N Phosphatpuffer pH 8.0, der 1% Lithiumchlorid enthielt, gelöst war. Zur Spaltung wurden 50 µl dieser Stammlösung mit 0.01-0.03 µmol Peptid in 1 ml 0.05 N Phosphatpuffer pH 8.0 bei 37°C inkubiert. Nach 2.5 h wurde die Reaktion durch Zugabe eines Tropfens konzentrierter HCl gestoppt (nicht bei C-terminalem Tryptophan),die Lösung eingeengt und getrocknet und die abgespaltene Aminosäure im Aminosäureanalysator nachgewiesen.

### 2.7.2. Spaltung mit C'ase B

Die Abspaltung von basischen Aminosäuren geschah mit Carboxypeptidase B. Die gleiche Menge Peptid wie oben angegeben wurde getrocknet und mit 1 ml 0.05 N Phosphatpuffer pH 8.0 aufgenommen. 25 µl der bereits gelösten Carboxypeptidase B-DFP ( 370 U/ml, Fa.Sigma, St.Louis, USA ) aus Hundepankreas wurden hinzugefügt und 2.5 h lang bei 37°C inkubiert. Die Beendigung der Reaktion und der Nachweis der C-terminalen Aminosäure geschah wie oben erwähnt.

### 2.7.3. Hydrazinolyse

Die Bestimmung C-terminaler Aminosäuren durch Hydrazinolyse erfolgte nach einer von AKABORI (50) angegebenen Methode in der Modifikation von BRAUNITZER (51). Ca 0.02 µmol Peptid wurden nach scharfem Trocknen in einem Hydrolysenröhrchen mit 3 ml Hydrazin ( wasserfrei, Fa. Roth, Karlsruhe) gelöst, im Trockeneis/Aceton-Bad eingefroren und dann abgeschmolzen. Nach achtstündiger Hydrazinolyse wurde die Lösung im Exikkator über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen, einige Glasperlen hinzugefügt und solange geschüttelt, bis alles gelöst war. Nach Zugabe von 4 Tropfen Isovaleraldehyd ( Fa.Merck, Darmstadt) wurde erneut 45 min lang geschüttelt. Die gebildeten Hydrazone wurden mit Äther extrahiert und die in der wässrigen Phase verbliebene C-terminale Aminosäure nach Trocknung wie üblich untersucht.

## 2.8. Enzymatische Peptidhydrolyse mit Aminopeptidase M (52)

0.02 µmol getrocknetes Peptid wurden in 1 ml 0.01 N Tris/HCl-Puffer pH 7.5 aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Aminopeptidase-M-Lösung (10%ig in obigem Puffer Fa.Roth, Karlsruhe) dauerte die Spaltung 24 h bei 37 °C. Das Hydrolysat wurde im Aminosäureanalysator untersucht.
Glutamin/Glutaminsäure und Asparagin/Asparaginsäure lassen sich nach enzymatischer Hydrolyse von Peptiden unterscheiden.

## 2.9. Nachspaltung mit Trypsin

1-2 µmol des gereinigten und charakterisierten Peptides wurden in 2 ml Wasser aufgenommen und der pH mit 0.02 N NaOH auf 8.0 eingestellt. 1 mg Trypsin (TPCK-behandelt, Fa.Merck,Darmstadt), gelöst in 500 µl Wasser, wurden zugesetzt und bei 37°C für 2.5 h gespalten. Nach Abbruch der Spaltung wurden die Spaltprodukte zunächst papierchromatographisch untersucht und dann je nach Ergebnis individuell verschieden getrennt.

## 2.10. Nomenklatur

T = tryptische Peptide. Sie sind nach ihrer Reihenfolge in der Kette numeriert.

Ch= chymotryptische Peptide. Sie sind mit der Angabe ihrer Position in der Kette versehen.

Wurden diese Spaltprodukte nochmals mit einem anderen Enzym verdaut, so sind die dadurch entstandenen Bruchstücke mit Kleinbuchstaben bezeichnet.

Außerdem werden folgende Symbole verwendet:

| | |
|---|---|
| —⟩ | Edman-Abbau mit Dansylierung |
| —// | Edman-Abbau mit Nachweis der Phenylthiohydantoine |
| ⟨— | Carboxypeptidase-Spaltung |
| ⟨⟨— | Hydrazinolyse |
| $R_{Leu}$ | In der Papierchromatographie $R_{F\text{-Peptid}}/R_{F\text{-Leucin}}$ |
| $R_{Lys}$ | In der Hochspannungselektrophorese $= \frac{p - n}{l - n}$ p = Wanderungsstrecke des Peptides, n = Wanderungsstrecke der neutralen Aminosäuren, l = Wanderungsstrecke des Lysins. Alle Strecken vom Start gemessen, bei Wanderung zur Anode mit negativem Vorzeichen für pH 6.5. |

| | |
|---|---|
| A | Aminosäureanalysen in molaren Verhältniszahlen nach 24 h Hydrolyse in 5.7 N HCl. |
| Z | Theoretische Zusammensetzung |
| + | Tryptophan positiver Nachweis mit Ehrlich's-Reagenz |
| AP-M | Spaltung mit Aminopeptidase-M |
| PTH | Phenylthiohydantoin |
| n.b. | nicht bestimmt |
| C'ase | Carboxypeptidase-Spaltung |

Für die Aminosäuren werden folgende Abkürzungen verwandt:

| | |
|---|---|
| Asp | Asparaginsäure |
| Thr | Threonin |
| Ser | Serin |
| Glu | Glutaminsäure |
| Pro | Prolin |
| Gly | Glycin |
| Ala | Alanin |
| Val | Valin |
| Leu | Leucin |
| Met | Methionin |
| Ile | Isoleucin |
| Tyr | Tyrosin |
| Phe | Phenylalanin |
| His | Histidin |
| Lys | Lysin |
| Trp | Tryptophan |
| Arg | Arginin |
| CM-Cys | Carboxymethylcystein |
| AÄ-Cys | Aminoäthylcystein |
| Gln | Glutamin |
| Glx | Glutamin/Glutaminsäure |
| Asn | Asparagin |
| Asx | Asparagin/Asparaginsäure |

## C. Ergebnisse

### 1. Reinigung und Charakterisierung der H-Kette

Sowohl monomeres als auch polymeres IgA TRO läßt sich in Gegenwart von 0.1 molar Dithiothreitol und 6 M Harnstoff vollständig reduzieren. Eine partielle Reduktion, bei der nur die Disulfidbrücken zwischen H- und L-Ketten geöffnet werden, gelingt dagegen bei einer Konzentration von nur 0.01 molar DTT ohne Harnstoffzusatz. Nach Zugabe von 0.3 molar Jodessigsäure bzw. Äthylenimin kann keine Reoxydation der Disulfidbrücken erfolgen.

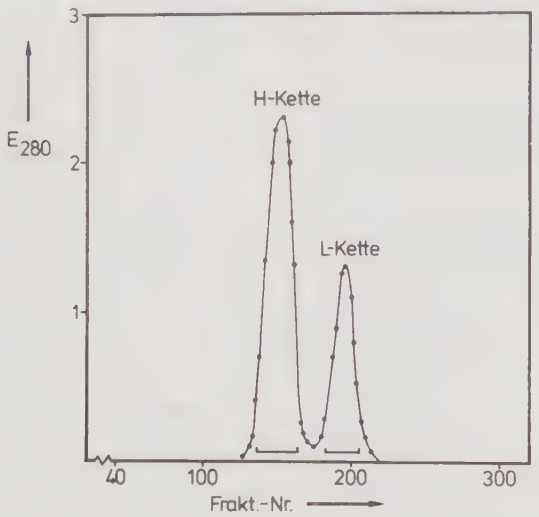



Abb.: 2 Trennung von H- und L-Ketten an Sephadex G 100 in 0.1 N Tris/HCl-Puffer, 6 M Harnstoff, pH 8.0. Säule 6.2 x 148 cm, Fließgeschw.: 50ml/h, Fraktionen zu 10 ml wurden gesammelt.

Trennungsversuche der partiell reduzierten Ketten an Sephadex G 100 und G 200 in verschiedenen Lösungsmitteln (10%ige oder 25%ige Essigsäure mit und ohne Harnstoffzusatz) zeigten ungenügende Ergebnisse. Die Ketten aggregieren in starkem Maße und lassen sich in diesem Milieu nicht trennen. Bessere Trennungen von H- und L-Ketten werden erreicht, wenn die vollständig reduzierten Ketten ohne vorherige Dialyse und Lyophilisation sofort auf eine Sephadex G 100 Säule in 0.1 N Tris/HCl-Puffer, 6 M Harnstoff, pH 8.0 gegeben werden. Die Abb. 2 zeigt eine derartige Trennung.

Die unter diesen Trennbedingungen gewonnenen Fraktionen unter den Gipfeln zeigen bei der Analyse auf 10.5%igen Polyacrylamid-Gelen in 0.1% Na-Dodecylsufat (SDS) praktisch reine H- und L-Ketten (Abb.3).

Abb.: 3 SDS-Gelelektrophorese in 10.5%igen Polyacrylamid-Gelen. links: H-Kette, Mitte: H- und L-Kette, rechts: L-Kette

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in Gegenwart von 0.1% SDS (53,54) geben außerdem Auskunft über das Molekulargewicht der Ketten. Die Molekulargewichts-Bestimmung, durchgeführt unter reduzierenden Bedingungen (0.1% 2-Mercaptoäthanol im Laufpuffer), ergibt im Testgemisch mit Proteinen bekannten Molekulargewichts (Rinderserumalbumin MG 66500, Carboxypeptidase B MG 34300, Ribonuclease MG 13700) für die α-Kette ein Molekulargewicht von etwa 61500 (Abb. 4). Ein Molekulargewicht dieser Größenordnung wird auch von anderen Autoren angegeben (55).

Das Molekulargewicht der L-Kette TRO (56)) kann nach dieser Bestimmung mit 25200 angegeben werden.

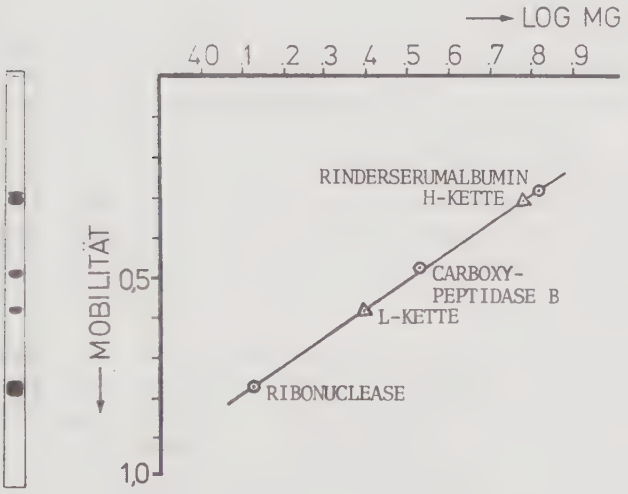



Abb.: 4 Molekulargewichts-Bestimmung nach WEBER und OSBORN (54). MG = Molekulargewicht

Bei der weiteren Charakterisierung der α-Kette durch Bestimmung des N-terminalen Restes läßt sich im Edman-Abbau keine Aminosäure nachweisen. Dieser Befund deutet auf ein zur Pyrrolidon-carbonsäure zyklisiertes Glutamin hin.

C-terminal besitzt die α-Kette ein Tyrosin, wie sich nach Hydrazinolyse zeigt. Dieser C-terminale Rest ist kettenspezifisch und wird auch von anderen Autoren angegeben (17).

Diese Hinweise zur Charakterisierung der α-Kette bestätigen das Vorliegen von Ausgangsmaterial in einer Reinheit, die für weitere Ermittlung der Primärstruktur ausreichend ist.

## 2. Spaltung der carboxymethylierten H-Kette mit Chymotrypsin und Isolierung der Peptide.

Die erste Auftrennung des Hydrolysats nach fünfstündiger Spaltung erfolgte an einer Anionenaustauscher-Säule (Dowex 1X2). Das Eluationsprofil dieser Vortrennung mit einem pH-Gradienten von pH 8.5 bis pH 1 ist in Abb. 5 wiedergegeben.

Der Großteil des eingesetzten Materials wird im neutralen und sauren Bereich des Gradienten eluiert. Hingegen sind relativ wenige und kleine Spaltprodukte im basischen Bereich zu erwarten.

Zur weiteren Aufarbeitung der nach dieser ersten Trennung gewonnenen Fraktionen bieten sich erneut Ionenaustascherharze an. Die Fraktionen des basischen bis schwach sauren Bereichs der Vortrennung lassen sich am besten an Kationenaustauschern (Dowex 50X2) rechromatographieren, während die stark sauren, teils in Wasser nur schwer löslichen Fraktionen erneut an Dowex 1X2 getrennt werden.
Die bei diesen Trennungen verwandten Puffersysteme enthalten zur Herabsetzung der Bindungsstärke des Austauschers Zusätze von 30 Vol% n-Propanol (6).
Die Ergebnisse dieser Trennungen sind in Abb. 6 wiedergegeben.

Keines der gesuchten Peptide war bereits nach diesen Rechromatographien genügend gereinigt, wie vorläufige papierchromatographische Untersuchungen aller gewonnenen Gipfel zeigten. Jedes zu trennende Gemisch wurde daher weiterhin individuellen Reinigungsschritten unterworfen. Präparative Papierchromatographie, phosphorylierte Cellulose, Sephadex-Gelfiltration bzw. Kombinationen dieser Trennverfahren waren hier die Mittel der Wahl.

Schwierigkeiten bereitete jedoch die Trennung und Reinigung zweier in den Fraktionen 14 und 15 eluierter Spalt-

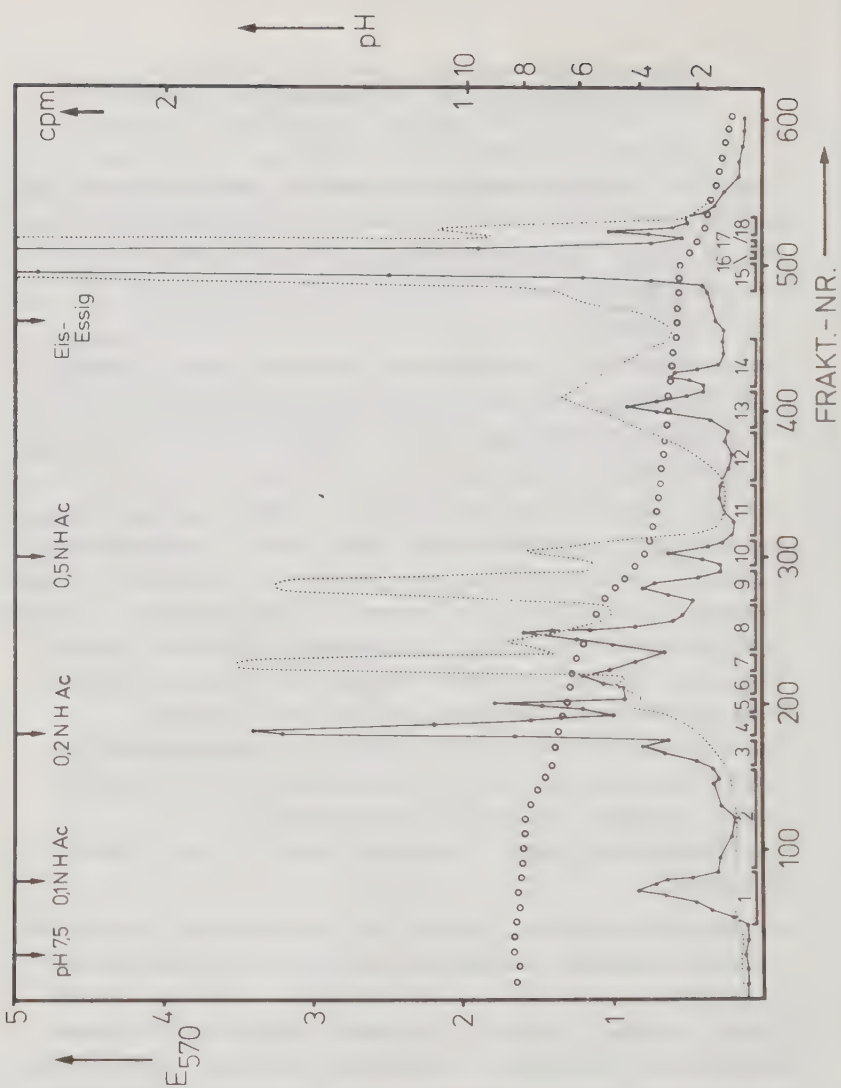



Abb. 5 Trennung des chymotryptischen Hydrolysats von 1.9 g carboxymethylierter H-Kette TRO an Dowex 1X2. ——— Ninhydrin, ooo pH, ···· $H^3$-Aktivität.

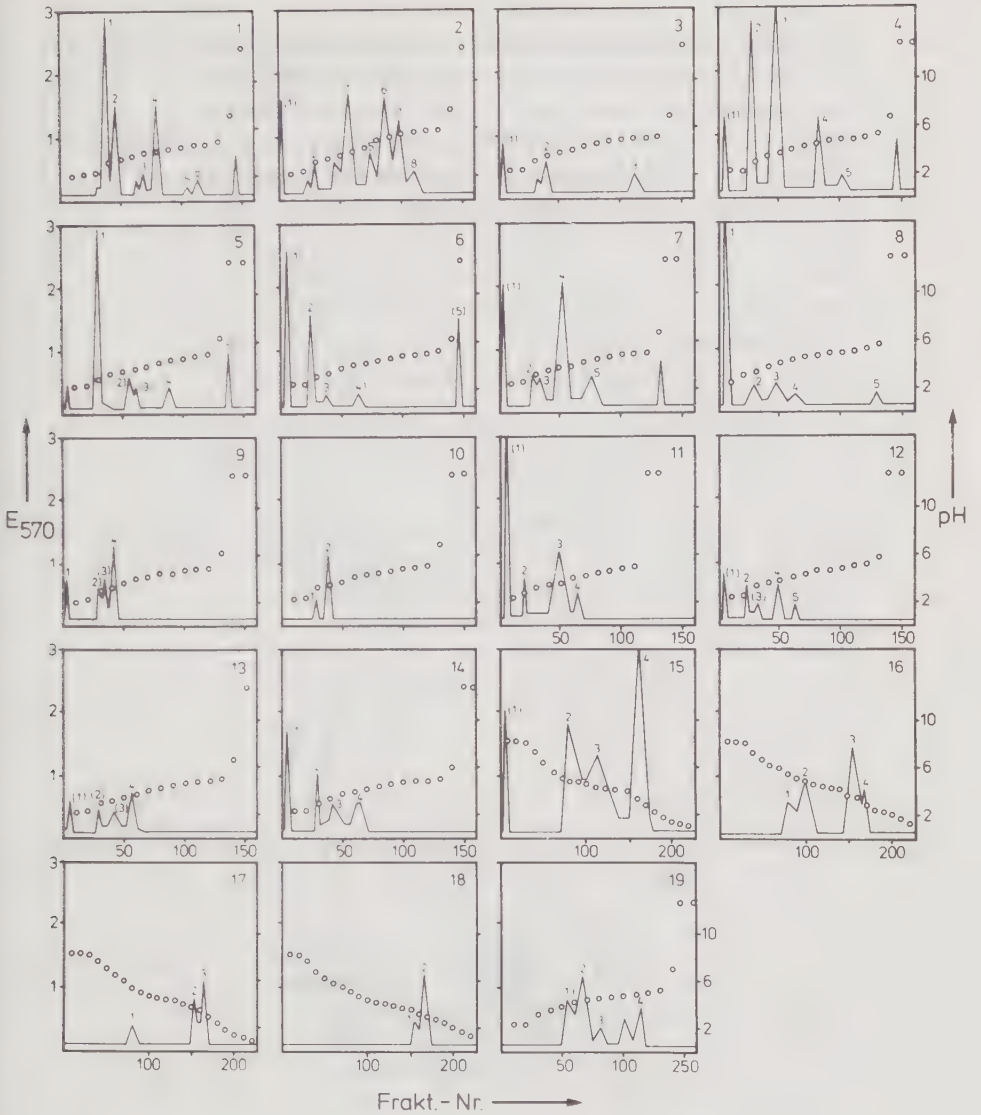



Abb. 6 Rechromatographien der in Abb. 5 eingezeichneten Gipfel 1-18. Rechromatographie 19 entstammt aus einem mit aminoäthylierter H-Kette durchgeführten Lauf. Trennungen 1-14 und 19 an Dowex 50X2, alle übrigen an Dowex 1X2.——— Ninhydrin, oooo pH. Eingeklammerte Ziffern kennzeichnen Gipfel, deren Zusammensetzung nicht näher untersucht wurde.

produkte, die durch Carboxypetidase-Spaltung und Aminosäureanalyse als ein Gemisch aus Ch 210-248, das sogenannte Hinge-Peptid, und als ein ungespaltenes Fragment Ch 249-279 identifiziert werden konnten. Beide Spaltstücke besitzen gebundene Kohlehydrate und sind von ähnlichem Molekulargewicht. Elektrophoretisch und papierchromatographisch wandern sie nicht. Das Bruchstück Ch 249-279 konnte im Verlauf der Isolierungsarbeiten außerdem in Form kleinerer Spaltprodukte isoliert werden, da es noch Spaltstellen besitzt, die von Chymotrypsin hydrolysiert werden.

Die zur Trennung dieser beiden Bruchstücke unternommenen Experimente (DEAE-Sephadex A25 in 0.02 N Tris/HCl -Puffer, pH 8.45, Salzgradient von 0.005 N NaCl bis 0.5 N NaCl, Sepharose Con A, Sephadex G 50) schlugen fehl, während in 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen zwei eng benachbarte Banden zu sehen sind.

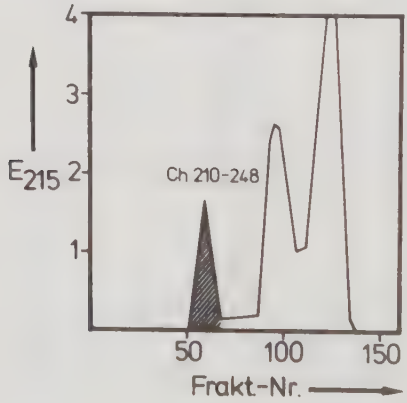



Abb.: 7 Trennung von Ch 210-248 an Sephadex G 50. Säule 1.3 x 200 cm, 0.8%iger Ammoniak.

Die Reinigung des Hinge-Peptides gelang schließlich nach erneuter Spaltung einer kleinen Menge (130 mg) carboxymethylierter H-Kette, die nach sehr langer Spaltdauer ( ca 15 h, 37 °C, 5 mg Enzym) in gleicher Weise wie beschrieben aufgearbeitet wurde.

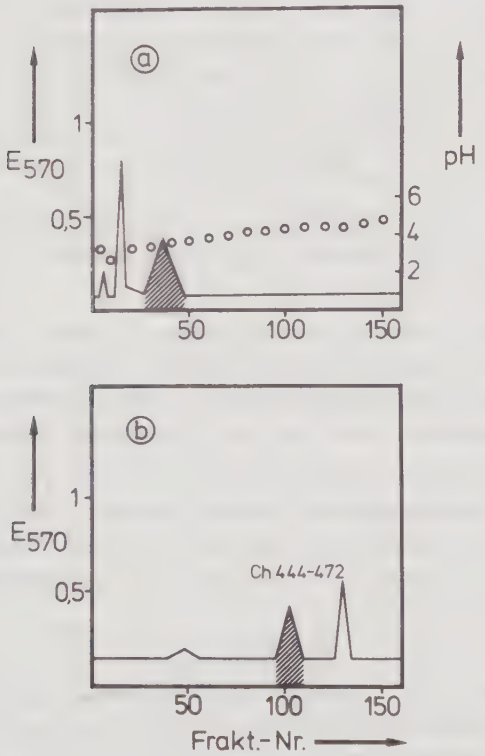



Abb.: 8 Reinigung von Ch 444-472 an phosphorylierter Cellulose (a) und anschließende Chromatographie an Sephadex G 75 in 35%iger Ameisensäure. Säule 1.3 x 200 cm, Fraktionen zu 1,2 ml (b).

In einer Fraktion dieses Ansatzes ließ sich das Hinge-Peptid papierchromatographisch lokalisieren und durch anschließende Sephadex G 50-Trennung (Abb.7) rein darstellen.

In größeren Mengen schwierig zu isolieren ist zudem das C-terminale Peptid Ch 444-472. Dieses Spaltprodukt verteilt sich bereits bei der ersten Trennung des Hydrolysats an Dowex 1X2 über einen weiten pH-Bereich. Aus der Fraktion 14-3 ließ sich jedoch auch dieses Peptid nach weiterer Reinigung an phosphorylierter Cellulose (Abb.8a) und anschließender Chromatographie an Sephadex G 75 in 35 %iger Ameisensäure (Abb. 8b) in zur Charakterisierung ausreichender Ausbeute darstellen.

So konnten bei der Aufarbeitung des mit Jodessigsäure carboxymethylierten Ansatzes fast alle chymotryptischen Peptide rein isoliert werden.

Einige weitere chymotryptische Peptide stammen indes aus einer H-Ketten-Präparation mit aminoäthyliertem Cystein, die ebenfalls aufgearbeitet wurde, auf deren Ergebnisse jedoch im einzelnen nicht weiter eingegangen werden soll.

Mit diesen Peptiden lassen sich alle chymotryptischen Peptide der α-Kette angeben. Neben diesen wurden eine Anzahl von Nebenspaltprodukten isoliert, wie sie für chymotryptische Spaltungen bei längerer Spaltdauer auftreten.

In Tabelle 5 sind die Aminosäureanalysen und charakteristischen Daten aller chymotryptischen Peptide und einiger Nebenspaltprodukte wiedergegeben. Die angegebenen Ausbeuten sind je nach Ausmaß der vorherigen Reinigungsoperationen in ihrer Höhe unterschiedlich. Bedingt durch Desamidierung von Glutamin und Asparagin treten die diese Aminosäuren enthaltenen Peptide in verschiedenen Fraktionen auf. Dieser Umstand erschwert u.a. eine exakte Ausbeutenangabe.

Tab. 5

Aminosäurezusammensetzungen und charakteristische Daten der chymotryptischen Peptide und einiger weiterer Spaltprodukte der α-Kette TRO.

Die Ausbeute der durch Carboxypeptidase-Spaltung bzw. Hydrazinolyse freigesetzten Aminosäuren sind in Bruchteilen der eingesetzten Menge angegeben.

[a] Spaltung mit Carboxypeptidase A+B. Alle weiteren C-terminalen Bestimmungen sind mit C'ase A durchgeführt.
[b] Werte nach 48 h Hydrolyse.
[c] Analyse des entsprechenden Peptides mit AÄ-Cystein.
[d] Nur nach Spaltung von aminoäthylierter H-Kette isoliert.
[e] Elektrophorese bei pH 7.8 durchgeführt.
[f] C'ase A mit nachfolgender Hydrazinolyse.

Tabelle 5.1

| Gipfel | 9-1; | | 17-1; | | 10-1; | | 1-3; 3-2; | | 2-3; | | 1-6; | | 8-3; 8-1; | | 16-2;17-1; | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 1-4 | | 1-11 | | 5-11 | | 5-18 | | 12-18 | | 19-20 | | 19-27 | | 21-27 | |
| $R_{Leu}$ | 1.05 | | 0.91 | | 0.70 | | 0.88 | | 0.74 | | 0.77 | | 0.90 | | 0.53 | |
| $R_{Lys}$ | n.b. | | n.b. | | neutral | | n.b. | | 0.35 | | n.b. | | neutral | | n.b. | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | | | 1.21 | (1) | 1.08 | (1) | 2.00 | (2) | 1.08 | (1) | | | 1.95 | (2) | 1.94 | (2) |
| Glu | 2.07 | (2) | 2.98 | (3) | 1.05 | (1) | 1.07 | (1) | | | | | | | | |
| Pro | | | | | | | 1.14 | (1) | 0.95 | (1) | | | | | | |
| Gly | | | 2.96 | (3) | 3.17 | (3) | 4.70 | (5) | 1.91 | (2) | | | 1.21 | (1) | 1.08 | (1) |
| Ala | | | | | | | | | | | | | 0.98 | (1) | 1.08 | (1) |
| Val | 1.00 | (1) | 2.00 | (2) | 0.90 | (1) | 2.08 | (2) | 0.99 | (1) | | | 0.84 | (1) | 1.07 | (1) |
| Met | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | 0.92 | (1) | 2.16 | (2) | 0.94 | (1) | 2.07 | (2) | 1.01 | (1) | 0.96 | (1) | 1.08 | (1) | | |
| Tyr | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | | | | | | | | | | | | | 1.04 | (1) | 0.98 | (1) |
| His | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | | | | | | | 1.06 | (1) | 0.97 | (1) | | | | | | |
| Arg | | | | | | | | | | | 1.04 | (1) | 1.02 | (1) | | |
| Trp | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CM-Cys | | | | | | | | | | | | | 0.90 | (1) | 0.60 | (1) |
| Summe | 4 | | 11 | | 7 | | 14 | | 7 | | 2 | | 9 | | 7 | |
| Ausbeute µMol | 0.5 | | 0.5 | | 0.8 | | 0.4 | | 0.8 | | 15 | | 1 | | 2 | |
| C'ase | Gln 0.72 | Leu 0.80 | Leu 0.94 | | Leu 0.94 | | Leu 0.83 | | Leu 0.99 | | | | Phe 1.02 | | Phe 1.12 | |
| Hydrazinolyse | Val 0.21 | Leu 0.80[f] | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 5.2

| Gipfel | 16-1; | | 12-5;14-4; | | 5-5; | | 7-3;8-2; | | 7-2;8-1; | | 2-5;2-6; | | 1-6; | | 7-5;8-4;14-4; | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 28-33 | | 34-38 | | 39-49 | | 50-52 | | 53-61 | | 62-70 | | 63-70 | | 71-82 | |
| $R_{Leu}$ | 0.93 | | 0.77 | | 0.78 | | 0.83 | | 0.89 | | 0.52 | | 0.81 | | 0.21 | |
| $R_{Lys}$ | neutral | | n.b. | | 0.19 | | n.b. | | n.b. | | 0.25 | | n.b. | | neutral | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | 1.05 | (1) | | | | | | | | | 0.94 | (1) | 1.01 | (1) | 1.91 | (2) |
| Thr | | | | | 1.04 | (1) | | | 0.95 | (1) | | | | | 1.05 | (1) |
| Ser | 0.96 | (1) | 1.04 | (1) | | | 1.00 | (1) | 1.97 | (2) | 0.97 | (1) | 1.00 | (1) | 1.89 | (2) |
| Glu | | | | | 2.19 | (2) | | | | | | | | | 1.13 | (1) |
| Pro | | | | | 1.05 | (1) | | | | | | | | | | |
| Gly | | | | | 2.04 | (2) | | | 3.21 | (3) | 1.05 | (1) | 1.10 | (1) | | |
| Ala | | | | | | | | | | | 0.97 | (1) | 1.03 | (1) | 1.01 | (1) |
| Val | | | | | | | 1.04 | (1) | | | 0.93 | (1) | 1.10 | (1) | | |
| Met | | | 0.95 | (1) | | | | | | | | | | | | |
| Ile | | | | | 0.88 | (1) | | | 0.94 | (1) | | | | | 0.93 | (1) |
| Leu | | | | | 0.92 | (1) | | | 1.00 | (1) | | | | | 1.00 | (1) |
| Tyr | 0.96 | (1) | | | | | 0.96 | (1) | 0.95 | (1) | 0.96 | (1) | | | 0.99 | (1) |
| Phe | 2.12 | (2) | | | | | | | | | 1.04 | (1) | 0.95 | (1) | | |
| His | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | | | | | 1.00 | (1) | | | | | 1.05 | (1) | 0.85 | (1) | 1.09 | (1) |
| Arg | 0.97 | (1) | | | 0.96 | (1) | | | | | 0.93 | (1) | 0.99 | (1) | 0.94 | (1) |
| Trp | | | + | (1) | + | (1) | | | | | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CM-Cys | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Summe | 6 | | 3 | | 11 | | 3 | | 9 | | 9 | | 8 | | 12 | |
| Ausbeute µMol | 0.8 | | 1.8 | | 0.5 | | 8 | | 2.5 | | 9 | | 5 | | 6.5 | |
| C'ase | Tyr 0.96<br>Phe 1.51<br>Asp 0.45<br>Arg 0.33 [a] | | Trp 1.00 | | Trp 0.54 | | Tyr 0.90 | | Tyr 1.04<br>Leu 0.95 | | Phe 0.95<br>Arg 0.98 [a] | | Phe 1.18<br>Arg 0.81 [a] | | Tyr 0.85<br>Leu 0.71<br>Ser 0.37<br>Lys 0.35 [a] | |
| Hydrazinolyse | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 5.3

| Gipfel | 5-1; | | 14-4; | | 18-2; | | 18-1; | | 1-1; | | 1-2; 2-2; | | 6-3; | | 15-4; | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 83-86 | | 87-96 | | 97-104e | | 105-109 | | 110-130 | | 119-130 | | 131-132 | | 133-146 [b][c] | |
| $R_{Leu}$ | 0.34 | | 0.34 | | 0.89 | | 1.07 | | 0.53 | | 0.96 | | 0.98 | | 0.40 | |
| $R_{Lys}$ | neutral | | -0.20 | | -0.34 | | neutral | | 0.13 | | 0.23 | | n.b. | | n.b. | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | 1.00 | (1) | 0.92 | (1) | 2.77 | (3) | 1.00 | (1) | 1.00 | (1) | | | | | 1.96 | (2) |
| Thr | | | 2.00 | (2) | 1.99 | (2) | | | 2.00 | (2) | 0.99 | (1) | | | 0.99 | (1) |
| Ser | | | 0.88 | (1) | 0.99 | (1) | 0.99 | (1) | 3.83 | (4) | 2.67 | (3) | 1.00 | (1) | 1.00 | (1) |
| Glu | 1.00 | (1) | 0.99 | (1) | | | | | 1.15 | (1) | | | | | 0.99 | (1) |
| Pro | | | | | | | | | 2.76 | (3) | 2.78 | (3) | | | 0.98 | (1) |
| Gly | | | | | | | | | 2.00 | (2) | | | | | 1.21 | (1) |
| Ala | | | 1.00 | (1) | 2.24 | (2) | | | 1.00 | (1) | 0.97 | (1) | | | 1.00 | (1) |
| Val | | | 0.97 | (1) | | | | | 2.96 | (3) | 1.07 | (1) | | | 1.85 | (2) |
| Met | 0.56 | (1) | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | | | | | | | | 0.95 | (1) |
| Leu | 1.05 | (1) | 1.06 | (1) | | | 1.00 | (1) | 1.86 | (2) | 1.03 | (1) | 0.99 | (1) | 0.97 | (1) |
| Tyr | | | 1.10 | (1) | 1.06 | (1) | 0.89 | (1) | | | | | | | | |
| Phe | | | | | 2.03 | (2) | | | 0.99 | (1) | 0.98 | (1) | | | | |
| His | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | | | | | | | | | 1.08 | (1) | 0.82 | (1) | | | | |
| Arg | | | 1.07 | (1) | | | | | | | | | | | | |
| Trp | | | | | 0.61 | (1) | + | (1) | | | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | | | | | | | | | | 1.73 | (2) |
| CM-Cys | | | | | 0.62 | (1) | | | | | | | | | | |
| Summe | 4 | | 10 | | 13 | | 5 | | 21 | | 12 | | 2 | | 14 | |
| Ausbeute µMol | 0.5 | | 1.4 | | 4.8 | | 1 | | 5.3 | | 1 | | 0.9 | | 0.7 | |
| C'ase | Asn 0.73<br>Met 0.48 | | Tyr 0.96<br>Val 0.90<br>Ala 0.88 | | Phe 0.86<br>Thr 0.36<br>Ser 0.25<br>Trp 0.14 | | Trp 0.84 | | Leu 0.85 | | Leu 0.78 | | | | Leu 0.93<br>Cys 0.63<br>Ile 0.56<br>Ala 0.51<br>Val 0.86 | |
| Hydrazinolyse | | | | | Phe 0.53 | | | | | | | | | | | |

Tabelle 5.4

| Gipfel | 12-2; | 11-3; 12-4; | 15-3; | 5-1; 6-2; | 4-2;5-1;8-1, | 19-3 [d] | 4-5; | 15-2; 15-4, 16-3; |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 147-156 | 157-160 | 161-183 | 184-189 | 190-195 | 196-197 | 198-209 | 210-246/248 |
| $R_{Leu}$ | 1.05 | 0.92 | 0.11 | 0.63 | 0.62 | 0.68 | 0.06 | 0.0 |
| $R_{Lys}$ | neutral | n.b. | neutral | neutral | neutral | n.b. | n.b. | n.b. |
| | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z |
| Asp | | | 2.85 (3) | | | | | 2.29 (2) |
| Thr | | 0.93 (1) | 1.00 (1) | 2.17 (2) | 2.02 (2) | | 0.97 (1) | 5.27 (6) |
| Ser | | 1.00 (1) | 3.84 (4) | 1.88 (2) | | | 1.03 (1) | 6.77 (7) |
| Glu | 2.79 (3) | | 2.99 (3) | 1.06 (1) | 1.06 (1) | | | 1.10 (1) |
| Pro | 2.10 (2) | | 1.82 (2) | | 0.97 (1) | | | 12.37 (13) |
| Gly | 1.16 (1) | | 2.93 (3) | | | | 1.20 (1) | |
| Ala | | | 1.98 (2) | | 1.02 (1) | | 1.04 (1) | |
| Val | 0.95 (1) | 1.07 (1) | 1.02 (1) | | | | 2.00 (2) | 3.33 (3) |
| Met | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | |
| Leu | 1.12 (1) | | 1.02 (1) | 0.99 (1) | 1.00 (1) | 1.02 (1) | | 1.49 (1-2) |
| Tyr | | | 0.93 (1) | | | | 0.99 (1) | |
| Phe | 2.00 (2) | | 1.03 (1) | | | | | |
| His | | | | | | | 1.82 (2) | 1.00 (1) |
| Lys | | | | | | | 2.05 (2) | |
| Arg | | | 1.05 (1) | | | | | 0.89 (1) |
| Trp | | + (1) | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | 0.92 (1) | | |
| CM-Cys | | | | | | | 1.03 (1) | 1.62 (3) |
| Summe | 10 | 4 | 23 | 6 | 6 | 2 | 12 | 38-39 |
| Ausbeute µMol | 1.5 | 2.5 | 5 | 4.2 | 3.6 | 0.3 | 1.2 | 1.2 |
| C'ase | Leu 0.41 | Trp 0.37 | Tyr 0.90<br>Leu 0.36 | Leu 1.01 | Gln<br>Thr } 1.55 | | Tyr 0.99<br>His 0.77<br>Lys 0.46 [a] | Leu 1.20<br>Ser 0.39 [f] |
| Hydrazinolyse | Leu 0.22 | | | | | | | Orn Ser Leu<br>0.51 0.93 1.48 |

Tabelle 5.5

| Gipfel | [d] | | 11-3;[b] | | 11-3; | | 19-2;[d] | | 7-4; | | 15-4;16-4; | | 6-2; | | 17-2; | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 210-240 | | 247-264 | | 249-264 | | 265-268 | | 269-279 | | 280-302 | | 303-308 | | 303-315 | |
| $R_{Leu}$ | 0.0 | | 0.15 | | 0.08 | | 0.59 | | 0.79 | | 0.39 | | 1.01 | | 0.64 | |
| $R_{Lys}$ | neutral | | n.b. | | n.b. | | n.b. | | neutral | | n.b. | | n.b. | | n.b. | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | 2.02 | (2) | 1.94 | (2) | 2.21 | (2) | | | 1.07 | (1) | 2.13 | (2) | | | | |
| Thr | 5.75 | (6) | | | | | 1.93 | (2) | 1.87 | (2) | 1.84 | (2) | | | | |
| Ser | 5.81 | (6) | 1.85 | (2) | 0.96 | (1) | | | 0.98 | (1) | 2.86 | (3) | 2.77 | (3) | 3.56 | (4) |
| Glu | 1.09 | (1) | 2.06 | (2) | 2.10 | (2) | | | | | 1.06 | (1) | | | 1.08 | (1) |
| Pro | 11.59 | (12) | 1.00 | (1) | 1.10 | (1) | | | | | 2.92 | (3) | | | 0.96 | (1) |
| Gly | | | 1.11 | (1) | 1.11 | (1) | | | 1.83 | (2) | 2.97 | (3) | | | 1.05 | (1) |
| Ala | | | 1.98 | (2) | 2.04 | (2) | | | 0.93 | (1) | 1.08 | (1) | | | 0.87 | (1) |
| Val | 2.53 | (3) | | | | | | | 1.02 | (1) | 1.06 | (1) | 2.18 | (2) | 2.08 | (2) |
| Met | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | | | 5.96 | (6) | 4.42 | (5) | 1.06 | (1) | 1.03 | (1) | 1.11 | (1) | 1.04 | (1) | 1.01 | (1) |
| Tyr | | | | | | | | | | | 1.03 | (1) | | | | |
| Phe | | | | | | | | | 1.00 | (1) | | | | | | |
| His | | | 1.10 | (1) | 0.60 | (1) | | | | | | | | | | |
| Lys | | | | | | | | | | | 0.91 | (1) | | | | |
| Arg | | | 1.10 | (1) | 0.99 | (1) | | | 1.01 | (1) | 0.99 | (1) | | | | |
| Trp | | | | | | | | | | | 0.80 | (1) | | | + | (1) |
| AÄ-Cys | 0.66 | (1) | | | | | 0.40 | (1) | | | | | | | | |
| CM-Cys | | | | | | | | | | | 1.49 | (2) | | | 0.53 | (1) |
| Summe | 31 | | 18 | | 16 | | 4 | | 11 | | 23 | | 6 | | 12 | |
| Ausbeute µMol | 1.0 | | 0.7 | | 0.4 | | 0.2 | | 3 | | 5.5 | | 2.4 | | 0.9 | |
| C'ase | | | Leu 0.79 | | Leu 0.60 | | Leu 0.88<br>Thr 0.43 | | Phe 0.77 | | Tyr 0.94 | | Leu 0.64<br>Val 0.40 | | Trp 0.38 | |
| Hydrazinolyse | Ser 0.29 | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle 5.6

| Gipfel | 17-3;18-2; | 2-4; 2-8; 2-7; | 9-4; | 5-1; 6-2; | 1-4; 2-4; 3-3; 7-3; | 3-3; 4-5; | 11-4; | 14-2; |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 309-315 | 316-321 | 322-334 | 335-338 | 339-345 | 346-350 | 346-359 | 351-359 |
| $R_{Leu}$ | 0.66 | 0.25 | 0.54 | 0.96 | 0.37 | 0.21 | 0.64 | 1.18 |
| $R_{Lys}$ | -0.60 | neutral[e] | -0.48 | n.b. | 0.32 | neutral[e] | n.b. | neutral |
| | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z | A Z |
| Asp | | 1.08 (1) | | | 1.06 (1) | | | |
| Thr | | 1.04 (1) | 3.09 (3) | 2.01 (2) | 1.00 (1) | | | |
| Ser | 0.92 (1) | | 1.01 (1) | | 1.90 (2) | | 0.92 (1) | 0.99 (1) |
| Glu | 1.08 (1) | | 1.00 (1) | | | 1.06 (1) | 3.01 (3) | 2.15 (2) |
| Pro | 0.90 (1) | | 2.18 (2) | | | 0.92 (1) | 4.09 (4) | 3.21 (3) |
| Gly | 1.03 (1) | 1.09 (1) | | | 1.11 (1) | | | |
| Ala | 0.96 (1) | | 2.04 (2) | 0.97 (1) | | | | |
| Val | | | | | | 0.87 (1) | 1.04 (1) | |
| Met | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | |
| Leu | | | 1.08 (1) | 1.01 (1) | | | 2.99 (3) | 2.88 (3) |
| Tyr | | | 0.98 (1) | | | | | |
| Phe | | 0.93 (1) | | | 1.01 (1) | | | |
| His | | 0.94 (1) | | | | 0.92 (1) | 0.95 (1) | |
| Lys | | 0.98 (1) | 1.00 (1) | | 0.90 (1) | | | |
| Arg | | | | | | 1.00 (1) | 1.08 (1) | |
| Trp | + (1) | | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | | | |
| CM-Cys | 0.73 (1) | | 0.93 (1) | | | | | |
| Summe | 7 | 6 | 13 | 4 | 7 | 5 | 14 | 9 |
| Ausbeute µMol | 1.8 | 5 | 3.2 | 1.4 | 6.3 | 2.6 | 0.8 | 0.6 |
| C'ase | Trp 0.48 | Phe 0.93<br>Thr 0.34<br>Lys 0.28 | Leu 0.30 | Leu 0.87 | Phe 0.93 | His 0.98<br>Val 0.45 | Leu 0.89 | Leu 0.95 |
| Hydrazinolyse | | [a] | | | | | | |

Tabelle 5.7

| Gipfel | 13-4;15-1; 16-3; | | 10-1;11-2; | | 19-2; | | 7-4;8-3; | | 1-5;2-5; | | 2-6;4-5; | | 4-4;5-4; | | 11-3;12-4; | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 351-367 | | 360-367 | | 368-370 [d] | | 368-374 | | 371-374 | | 375-383 | | 384-395 | | 396-398 | |
| $R_{Leu}$ | 0.64 | | 1.22 | | 0.56 | | 0.73 | | 0.64 | | 0.74 | | 0.40 | | 1.07 | |
| $R_{Lys}$ | n.b. | | neutral | | n.b. | | neutral | | n.b. | | n.b. | | neutral | | n.b. | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | 1.00 | (1) | 0.94 | (1) | | | | | | | 1.04 | (1) | | | | |
| Thr | 1.10 | (1) | 1.01 | (1) | 1.11 | (1) | 1.03 | (1) | | | | | | | 1.03 | (1) |
| Ser | 1.14 | (1) | | | | | | | | | 1.00 | (1) | 1.01 | (1) | | |
| Glu | 2.98 | (3) | 1.04 | (1) | | | | | | | | | 3.73 | (4) | | |
| Pro | 2.96 | (3) | | | | | | | | | 0.98 | (1) | 0.97 | (1) | | |
| Gly | | | | | | | 1.15 | (1) | 1.09 | (1) | | | 1.10 | (1) | | |
| Ala | 1.00 | (1) | 1.05 | (1) | | | 1.01 | (1) | 1.00 | (1) | | | | | | |
| Val | 1.11 | (1) | 1.06 | (1) | | | | | | | 2.10 | (2) | | | | |
| Met | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | 4.30 | (6) | 3.00 | (3) | 1.05 | (1) | 0.98 | (1) | | | 0.94 | (1) | 2.02 | (2) | 0.96 | (1) |
| Tyr | | | | | | | | | | | | | 0.93 | (1) | | |
| Phe | | | | | | | 0.98 | (1) | 0.92 | (1) | | | | | | |
| His | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | | | | | | | | | | | 0.90 | (1) | 0.98 | (1) | | |
| Arg | | | | | | | 1.01 | (1) | 1.00 | (1) | 1.04 | (1) | 1.04 | (1) | | |
| Trp | | | | | | | | | | | + | (1) | | | + | (1) |
| AÄ-Cys | | | | | 0.83 | (1) | | | | | | | | | | |
| CM-Cys | | | | | | | 0.88 | (1) | | | | | | | | |
| Summe | 17 | | 8 | | 3 | | 7 | | 4 | | 9 | | 12 | | 3 | |
| Ausbeute µMol | 1.4 | | 1.3 | | 0.5 | | 6.4 | | 3.7 | | 1.6 | | 2.9 | | 1.7 | |
| C'ase | Leu 1.27<br>Thr 0.45 | | Leu 1.15<br>Thr 0.74<br>Val 0.73 | | | | Phe 0.91<br>Gly 0.54<br>Arg 0.54 | | Phe 0.92 | | Trp 0.94<br>Arg 0.38 | | Tyr 0.68<br>Lys 0.64 | | Trp 0.79 | |
| Hydrazinolyse | | | | | | | [a] | | | | [a] | | [a] | | | |

Tabelle 5.8

| Gipfel | 4-3; | | 4-2;5-1; | | 8-5; | | 2-6; | | 10-2; | | 6-3;7-3; | | 14-3; | | 1-5, | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ch | 399-411 | | 412-417 | | 418-430 | | 425-430 | | 431-441 | | 442-443 | | 444-472[b] | | 444-451 | |
| $R_{Leu}$ | 0.27 | | 1.16 | | 0.34 | | 0.19 | | 0.64 | | 1.07 | | 0.0 | | 0.48 | |
| $R_{Lys}$ | neutral | | neutral | | n.b. | | 0.34 | | n.b. | | n.b. | | n.b. | | n.b. | |
| | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z | A | Z |
| Asp | | | | | 1.93 | (2) | 1.05 | (1) | | | | | 2.73 | (3) | 1.08 | (1) |
| Thr | 2.78 | (3) | 1.06 | (1) | 0.98 | (1) | 0.92 | (1) | | | | | 3.60 | (4) | 2.02 | (2) |
| Ser | 2.08 | (2) | 0.92 | (1) | | | | | 1.01 | (1) | | | 1.01 | (1) | | |
| Glu | 3.20 | (3) | | | 1.03 | (1) | | | 0.98 | (1) | | | 2.11 | (2) | 1.04 | (1) |
| Pro | 0.93 | (1) | | | | | | | 0.97 | (1) | | | 1.18 | (1) | | |
| Gly | 1.07 | (1) | | | 1.32 | (1) | 1.12 | (1) | 1.02 | (1) | | | 2.13 | (2) | | |
| Ala | 1.01 | (1) | 1.05 | (1) | 2.19 | (2) | | | 1.01 | (1) | 0.99 | (1) | 2.01 | (2) | | |
| Val | | | 1.04 | (1) | 0.93 | (1) | | | 1.03 | (1) | | | 4.03 | (5) | | |
| Met | | | | | | | | | 0.89 | (1) | | | 0.92 | (1) | | |
| Ile | | | 0.96 | (1) | | | | | | | | | 0.87 | (1) | 0.88 | (1) |
| Leu | | | 0.94 | (1) | | | | | 2.00 | (2) | | | 1.13 | (1) | 0.86 | (1) |
| Tyr | | | | | | | | | | | | | 0.95 | (1) | | |
| Phe | 1.04 | (1) | | | 0.95 | (1) | 1.02 | (1) | | | 1.01 | (1) | | | | |
| His | | | | | | | | | 0.93 | (1) | | | 1.02 | (1) | | |
| Lys | | | | | 1.88 | (2) | 2.23 | (2) | | | | | 1.82 | (2) | 0.93 | (1) |
| Arg | 1.01 | (1) | | | 0.89 | (1) | | | | | | | 0.98 | (1) | 1.00 | (1) |
| Trp | | | | | + | (1) | | | | | | | | | | |
| AÄ-Cys | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CM-Cys | | | | | | | | | 0.90 | (1) | | | 0.90 | (1) | | |
| Summe | 13 | | 6 | | 13 | | 6 | | 11 | | 2 | | 29 | | 8 | |
| Ausbeute µMol | 15.2 | | 2.9 | | 0.3 | | 3.8 | | 2.4 | | 2.4 | | 0.9 | | 0.4 | |
| C'ase | Phe 1.06<br>Thr 1.84<br>Gly 0.47[f] | | Leu 0.95<br>Ile 0.87<br>Ser 0.30 | | Phe 0.72 | | Phe 0.73 | | Leu 0.64 | | | | Tyr 0.75<br>CM-Cys 0.15<br>Thr 0.06 | | Leu 0.60<br>Arg 0.32<br>[a] | |
| Hydrazinolyse | Glu 0.23 | | | | | | | | | | | | | | | |

# 3. Die Aufstellung der Primärstruktur

## 3.1 Die tryptischen Peptide

Zu Beginn der hier beschriebenen Isolierungs- und Reinigungsarbeiten an den chymotryptischen Peptiden waren auch die tryptischen Peptide der α-Kette TRO nicht bekannt.

Inzwischen sind in parallel verlaufender Arbeit 40 tryptische Peptide isoliert und sequenziert worden (26), die ausreichen, um im Zusammenhang mit den chymotryptischen Peptiden die vollständige Sequenz der Kette aufzustellen. Die Abb. 9 gibt eine Aufstellung dieser tryptischen Peptide wieder.
Abgeschlossen sind außerdem die Reinigungsarbeiten und die Charakterisierung von 5 Fragmenten, die nach Spaltung der Kette mit Bromcyan erhalten werden (27). Auch diese Fragmente geben für die Aufstellung der Primärstruktur wichtige Informationen.

Damit sind alle Voraussetzungen für die Rekonstruktion der α-Kette unter Zuhilfenahme der erwähnten tryptischen Bruchstücke und der Bromcyan-Fragmente geschaffen und die Diskussion der Überlappungen kann beginnen.

T1 : Glp-Val-Glx-Leu-Val-Glx-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys Pro-Gly-Gly Ser-Leu-Arg

T2 : Leu-Ser-Cys-Val-Ala-Ser-Gly-Phe-Ser-Phe-Arg

T3 : Asx-Phe-Tyr-Met-Ser-Trp-Ile-Arg

T4 : Glx-Thr-Pro-Gly-Lys

T5 : Gly-Leu-Glx-Trp-Val-Ser-Tyr-Ile-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Thr-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Asx-Ser-Val-Lys

T6 : Gly-Arg

T7 : Phe-Thr-Ile-Ser-Arg

T8 : Asx-Asx-Ala-Glx-Lys

T9 : Ser-Leu-Tyr-Leu-Glx-Met-Asx-Ser-Leu-Arg

T10 : Thr-Glx-Asx-Thr-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ala-Thr-Asx-Asx-Phe-Asx-Trp-Ser-Thr-Phe-Ser-Leu-Asx-Tyr-Trp-Gly-Glx-Gly-Asx-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser-Ala-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Lys

T11 : Val-Phe-Pro-Leu-Ser-Leu-Cys

T12 : Ser-Thr-Glx-Pro-Asx-Glx-Asx-Val-Val-Ile-Ala-Cys

T13 : Leu-Val-Glx-Gly-Phe-Phe-Pro-Glx-Glx-Pro-Leu-Ser-Val-Thr-Trp-Ser-Glx-Ser-Gly-Glx-Gly-Val-Thr-Ala-Arg

T14 : Asx-Phe-Pro-Pro-Ser-Glx-Asx-Ala-Ser-Gly-Asx-Leu-Tyr-Thr-Thr-Ser-Ser-Glx-Leu-Thr-Leu-Pro-Ala-Thr-Glx-Cys-Leu-Ala-Gly-Lys

T15 : Ser-Val-Thr-Cys-His-Val-Lys

T16 : His-Tyr-Thr-Asx-Pro-Ser-Glx-Asx-Val-Thr-Val-Pro-Cys-Pro-Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys

T17 : Cys

T18 : His-Pro-Arg

T19 : Leu-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Ala-Leu-Glx-Asx-Leu-Leu-Leu-Gly-Ser-Glx-Ala-Asx-Leu-Thr-Cys-Thr-Leu-Thr-Gly-Leu-Arg

T20 : Asx-Ala-Ser-Gly-Val-Thr-Phe-Thr-Trp-Thr-Pro-Ser-Ser-Gly-Lys

T21 : Ser-Ala-Val-Glx-Gly-Pro-Pro-Asx-Arg

T22 : Asx-Leu-Cys

T23 : Gly-Cys

T24 : Tyr-Ser-Val-Ser-Ser-Val-Leu-Ser-Gly-Cys

T25 : Ala-Glx-Pro-Trp-Asx-His-Gly-Lys

T26 : Thr-Phe-Thr-Cys-Thr-Ala-Ala-Tyr-Pro-Glx-Ser-Lys

T27 : Thr-Pro-Leu-Thr-Ala-Thr-Leu-Ser-Lys

T28 : Ser-Gly-Asx-Thr-Phe-Arg-Pro-Glx-Val-His

T29 : Leu-Leu-Pro-Pro-Pro-Ser-Glx-Glx-Leu-Ala-Leu-Asx-Glx-Leu-Val-Thr-Leu-Thr-Cys

T30 : Leu-Ala-Arg

T31 : Gly-Phe-Ser-Pro-Lys

T32 : Asx-Val-Leu-Val-Arg

T33 : Trp-Leu-Glx-Gly-Ser-Glx-Glx-Leu-Pro-Arg

T34 : Glx-Lys-Tyr-Leu-Thr-Trp-Ala-Ser-Arg

T35 : Glx-Glx-Pro-Ser-Glx-Gly-Thr-Thr-Thr-Phe-Ala-Val-Thr-Ser-Ile-Leu-Arg

T36 : Val-Ala-Ala-Glx-Asx-Trp-Lys

T37 : Lys-Gly-Asx-Thr-Phe-Ser-Cys

T38 : Met-Val-Gly-His-Glx-Ala-Leu-Pro-Leu-Ala-Phe-Thr-Glx-Lys

T39 : Thr-Ile-Asx-Arg

T40 : Leu-Ala-Gly-Lys-Pro-Thr-His-Val-Asx-Val-Ser-Val-Val-Met-Ala-Glx-Val-Asx-Gly-Thr-Cys-Tyr

Abb. 9 Die tryptischen Peptide der α-Kette TRO (26).

## 3.2 Zuordnung der tryptischen Peptide durch chymotryptische Überlappungspeptide.

### Der N-Terminus

Führt man an der gesamten H-Kette einen Edman-Abbau durch, so läßt sich N-terminal keine Aminosäure nachweisen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen an H-Ketten der Subgruppen I, II, III. N-terminales Glutamin ist in diesen Fällen zu Pyrrolidon-5-carbonsäure zyklisiert.

Unter allen isolierten chymotryptischen Peptiden befindet sich nur eines mit blockiertem N-Terminus. Es handelt sich um das Tetrapeptid Ch 1-4. Ein identisches Bruchstück läßt sich nach chymotryptischer Nachspaltung eines blockierten tryptischen Peptides isolieren, das C-terminal ein Arginin besitzt (26). Dieses 19 Reste umfassende tryptische Peptid ist demnach das T1 der H-Kette. Ihm lassen sich außerdem die chymotryptischen Peptide Ch 1-4, Ch 1-11, Ch 5-11, Ch 5-18 und Ch 12-18 zuordnen. Das Glutamin in Pos.3 ließ sich am Bruchstück Ch 1-4 durch Carboxypeptidase-Spaltung, die vollständige Sequenz durch nachfolgende Hydrazinolyse bestimmen (siehe Tab. 5).

### Die Überlappung T1-T2 (Abb. 10)

Die Überlappung der ersten beiden tryptischen Bruchstücke verlangt ein mit Arginin beginnendes chymotryptisches Peptid. Ein solches liegt mit dem Dipetid Ch 19-20 vor, das wiederum ein nachfolgendes, mit Leucin beginnendes tryptisches Peptid notwendig macht. N-terminales Leucin findet sich bei 6 tryptischen Peptiden (T2, T13, T19, T29, T30, T39). Da allerdings bei der tryptischen Nachspaltung

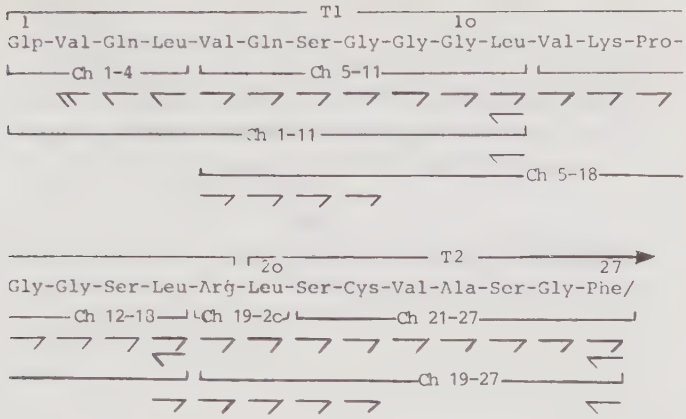



Abb. 10

des ersten BrCN-Fragmentes der Kette, das dem N-terminalen Ende der H-Kette entspricht, nur T2 isoliert wurde (27), scheiden alle weiteren tryptischen Peptide aus. Auch ein in geringer Ausbeute isoliertes chymotryptisches Peptid, Ch 19-27, das weit in das Bruchstück T2 hineinreicht, erleichtert die Zuordnung. Das ebenfalls mit Arginin beginnende Peptid Ch 418-430 kommt für diese Überlappung nicht in Frage, da diese Sequenz im BrCN-Fragment 3 lokalisiert wurde (27). Glutamin in Pos. 6 ergibt sich aus der elektrophoretischen Neutralität von Ch 5-11 bei pH 6.5.

Die Überlappung T2 -T3 (Abb. 11)

Die drei C-terminalen Aminosäuren des T2 lauten Ser-Phe-Arg. Diese Sequenz findet sich unter den chymotryptischen Bruchstücken im Ch 28-33 wieder, welches damit die Überlappung zum T3 bildet. Diesem, aus einigen sehr charakteristischen Aminosäuren bestehenden Peptid, läßt sich leicht das chymotryptische Spaltstück Ch 34-38 zuordnen. Asparaginsäure in Pos. 31 ließ sich ebenfalls elektrophoretisch bestimmen.

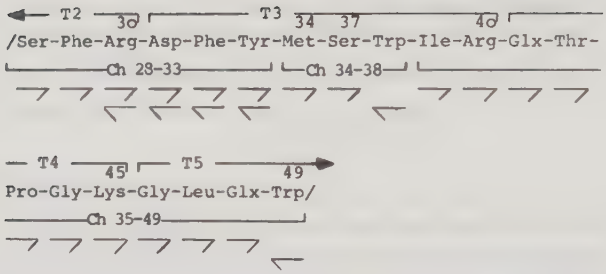



Abb.: 11

Die Überlappungen T3-T4-T5 (Abb.11)

Das Peptid Ch 35-49 enthält neben den beiden Aminosäuren Isoleucin und Tryptophan einen Lysin- und einen Arginin-Rest, und ist dadurch in der Lage, zwei Überlappungen zu gewährleisten, die sich eindeutig aus den ermittelten Sequenzen der beteiligten Peptide ergeben. Dem 16 Reste umfassenden T5 gehören weiterhin die Bruchstücke Ch 50-52 und Ch 53-61 an.

Die Überlappungen T5-T6-T7 (Abb. 12)

Das Peptid Ch 62-70 ist in seinen ersten 6 Schritten im Dansyl-Edman-Abbau identisch mit den C-terminalen Resten des T5 (26). Es umfaßt das Dipeptid T6 und besitzt mit dem T7 das endständige Phenylalanin gemeinsam. Die Unsicherheit der Überlappung mit nur einer Aminosäure fällt hier nicht ins Gewicht, da sich unter den tryptischen Fragmenten nur eines mit N-terminalem Phenylalanin befindet. Ebenfalls in guter Ausbeute wurde Ch 63-70 isoliert, das gegenüber Ch 62-70 einen Tyrosin-Rest weniger enthält. Asparaginsäure in Pos. 64 konnte nach Hydrolyse mit Aminopeptidase M an Ch 62-70 bestimmt werden. (Tab. 6)

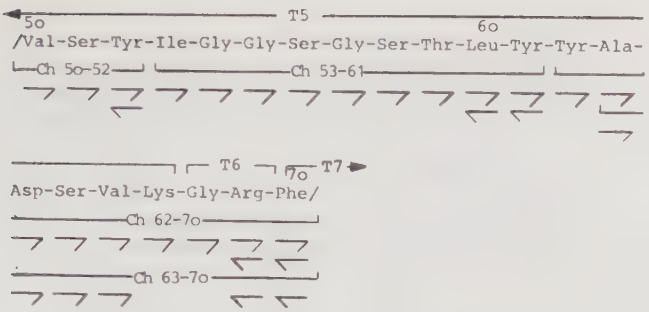



Abb.: 12

| Ch 62-7O | | |
|---|---|---|
| AP-M | | |
| Asp | 0.69 | (1) |
| Ser | 0.65 | (1) |
| Gly | 0.45 | (1) |
| Ala | 0.81 | (1) |
| Val | 0.61 | (1) |
| Tyr | 0.93 | (1) |
| Phe | 1.00 | (1) |
| Lys | 0.62 | (1) |
| Arg | 1.04 | (1) |

Tab.: 6

Die Überlappungen T7-T8-T9 (Abb. 13)

Der weitere Sequenzverlauf des T7, dessen N-terminales Phenylalanin noch für die letzte Überlappung in Anspruch genommen wurde, entspricht dem N-Terminus von Ch 71-82. Das chymotryptische Spaltprodukt überlappt ein nur 5 Reste umfassendes Lysin-Peptid, T8, und kann durch seine C-terminale Ser-Leu-Tyr-Sequenz eindeutig mit T9 verknüpft werden. Das Methionin-haltige Peptid Ch 83-86 läßt sich ebenfalls in T9 einpassen. Glutamin in Pos. 84 und Asparagin in Pos. 86 ergeben sich aus dem elektrophoretischen Verhalten dieses Peptides.

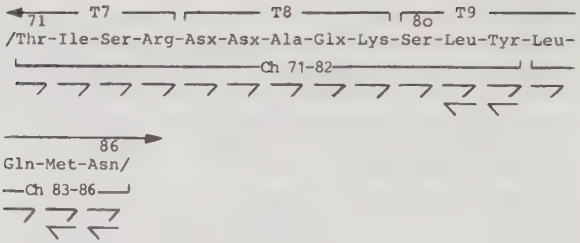



Abb. 13

Die Überlappungen T9-T10 und T10-T11 (Abb. 14)

Die Überlappung von T9 und T10 erfolgt durch das chymotryptische Peptid Ch 87-96. Das Bruchstück T10 besteht aus insgesamt 49 Aminosäuren und ist damit das größte tryptische Peptid. Seine Reinigung gestaltete sich außerordentlich schwierig. Zur Sequenzermittelung wurden daher

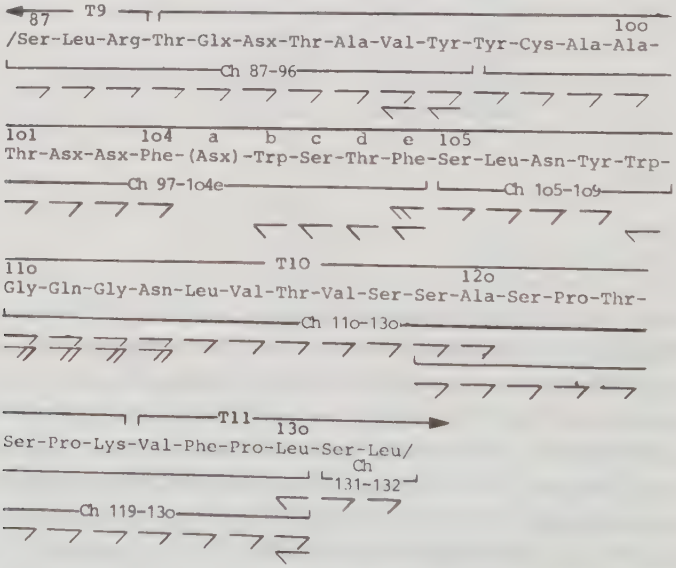



Abb. 14

alle hierzu notwendigen Arbeiten an den Bruchstücken Ch 97-1o4e und Ch 1o5-1O9 durchgeführt, die beide dem T1O angehören. Die C-terminale Sequenz des Ch 97-1O4e wurde durch Hydrazinolyse und Carboxypeptidase-Spaltung bestimmt. Eine Carboxypeptidase-Spaltung zeigte außerdem, daß im Peptid Ch 1O5-1O9 das Tryptophan C-terminnal steht. Außerdem läßt sich anhand des $R_{Lys}$-Wertes dieses Peptides Asparagin in Pos. 1O7 angeben. Erstaunlich ist, daß in beiden Peptiden einige in der Regel von Chymotrypsin gespaltenen Bindungen intakt blieben.

Zwei weitere dem T1O zuordnenbare Peptide sind Ch 11O-13O und ein Teil dieses Bruchstückes, das Ch 119-13O. Die Amide in Pos. 131 und 133 wurden dünnschichtchromatographisch als PTH-Derivate identifiziert. Beide Bruchstücke besitzen C-terminal vier gemeinsame Aminosäuren mit T11, das mit einer Val-Phe-Pro-Leu-Sequenz beginnt. Auch ein kleines Peptid Ch 131-132 läßt sich an dieser Stelle zuordnen.

Die Überlappungen T11-T12 und T12-T13 (Abb. 15)

Die folgenden Überlappungen durch Ch 133-146 sind aufgrund ihrer minimalen Kürze von nur einem Rest N- und C-terminal problematisch. Es handelt sich um ein Peptid mit zwei Cystein-Resten, das zudem auch in seiner Sequenz mit einem Cystein beginnt.

Ein weiteres mit Cystein beginnendes chymotryptisches Peptid, Ch 196-197, kommt für die Überlappung an dieser Stelle nicht in Frage, da es sich an anderer Stelle zwanglos einfügen läßt (siehe Pos. 196-197). Das C-terminale Leucin von Ch 133-146 bildet die Verknüpfung zum T13. Theoretisch wäre auch die Anordnung anderer mit Leucin beginnender tryptischer Peptide denkbar. Doch wird sich im Verlauf der Diskussion zwingend ergeben,

daß diese Fragmente anderen Bereichen der Polypetidkette angehören.

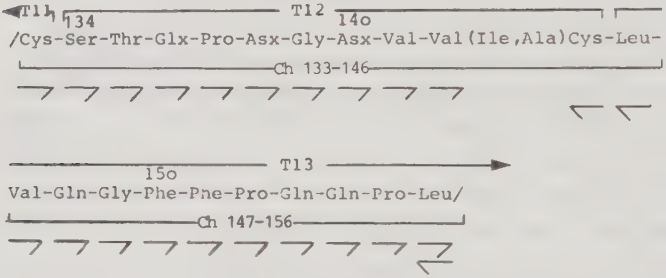



Abb.: 15

Weitere dem T13 zuordnenbare chymotryptische Peptide sind Ch 147-156, das aufgrund seines Elektrophorese-Verhaltens in den Pos. 148, 153 und 154 Glutamine besitzt, und außerdem das Ch 157-160. Beide Peptide sind durch Dansyl-Edman-Abbau und Carboxypeptidase-Spaltung charakterisiert.

Die Überlappung T13-T14 (Abb. 16)

Ein relativ großes chymotryptisches Spaltprodukt, das Ch 161-183, beginnt mit der Sequenz Ser-Glx-Ser-Gly.. . Es besitzt ein Arginin und ist daher das Überlappungspeptid von T13 zu einem weiteren tryptischen Peptid. Durch tryptische Nachspaltung von Ch 161-183 lassen sich nach der Trennung an Dowex 50X2 (Abb. 17) zwei Bruchstücke isolieren (Tab. 7), von denen das Ch t-171-183 elf Reste mit T14 gemeinsam besitzt.

Eine Elektrophorese des Nachspaltproduktes Ch t-161-170 bei pH 6.5 zeigt, daß das Peptid neutral ist. Nach Edman-Abbau der ersten zwei Rest und erneuter Elektophorese bei diesem pH wandert es jedoch zur Kathode. Damit läßt sich für Pos.162 Glutaminsäure und Pos. 165 Glutamin angeben.

Ebenfalls dem Peptid T14 gehören die chymotryptischen Peptide Ch 184-189, Ch 190-195 und das bereits erwähnte Ch 196-197 an. Die Amide in Pos. 188 und 195 sind elektrophoretisch bzw. durch Carboxypeptidase-Spaltung bestimmt.

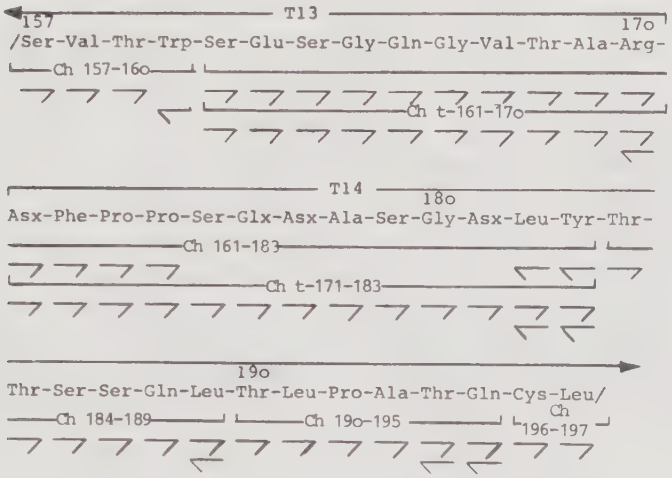



Abb.: 16

Die Überlappungen T14-T15-T16 (Abb. 18)

Aus den stark basischen Peptiden ließ sich Ch 198-209 isolieren. Das Peptid besitzt zwei Lysine und liefert dadurch zwei Überlappungen. Mit zwei Histidinen, einem Cystein und einem Tyrosin ist es ein recht markantes Peptid. Versucht man, seine Sequenz in Einklang mit denen tryptischer Peptiden zu bringen, so lassen sich die Bruchstücke T14, T15 und T16 hier einordnen.

| Ch 161-183 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Ch-t-161-170 | | Ch-t-171-183 | |
| $R_{Leu}$<br>$R_{Lys}$ | 0.16<br>neutral | | 0.63<br>n.b. | |
| Asx | | | 2.60 | (3) |
| Thr | 1.00 | (1) | | |
| Ser | 1.96 | (2) | 1.88 | (2) |
| Glx | 2.03 | (2) | 1.00 | (1) |
| Pro | | | 2.08 | (2) |
| Gly | 2.23 | (2) | 1.02 | (1) |
| Ala | 1.03 | (1) | 1.06 | (1) |
| Val | 1.08 | (1) | | |
| Leu | | | 1.00 | (1) |
| Tyr | | | 1.02 | (1) |
| Phe | | | 0.97 | (1) |
| Arg | 0.96 | (1) | | |
| Summe | | 10 | | 13 |
| C'ase | Arg 0.81<br>C'ase B | | Tyr 0.90<br>Leu 0.36<br>C'ase A | |

Tab.: 7

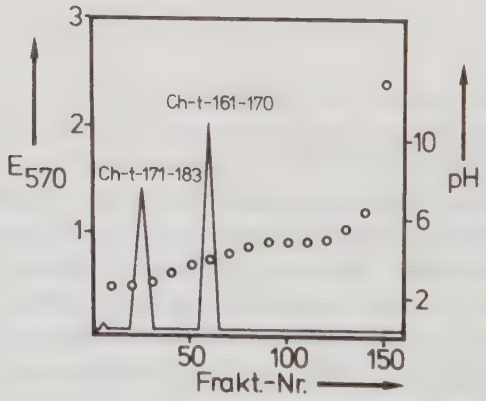



Abb.17 Trennung der Spaltprodukte aus der tryptischen Nachspaltung von Ch 161-183 an Dowex 50X2.

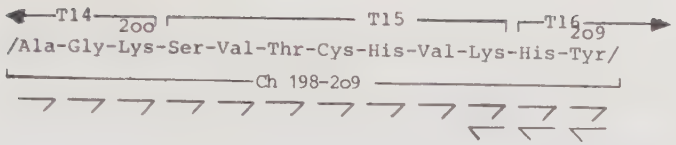



Abb.: 18

Die Überlappungen T16-T17-T18-T19 (Abb. 19)

Das aus 38 Aminosäuren und einem hohen Anteil an Kohlehydraten bestehende Ch 210-248 stellt das größte chymotryptische Bruchstück dar. Es ist reich an Threonin, Serin und Prolin und besitzt insgesamt 3 Cystein-Reste. Es entspricht dem Hinge-Bereich der Kette. Ein nur die ersten 31 Reste umfassendes Fragment, Ch 210-240, ließ sich ebenfalls nach Reinigung über Dowex 50X2 aus dem Ansatz mit aminoäthyliertem Cystein isolieren.

Die tryptische Nachspaltung des Hinge-Peptides Ch 210-248 (Trennung durch präparative Papierchromatographie) setzt ein Tripeptid Leu-Ser-Leu und ein einzelnes Leucin frei. Weiterhin wurde Ch t-210-245 isoliert, dessen endständiges Arginin durch Hydrazinolyse bestimmt werden konnte (Tab.8). Diese C-terminale Sequenz war bereits durch Carboxypeptidase-Spaltung und anschließende Hydrazinolyse am ungespaltenen Hinge-Peptid festgestellt worden. Die bei der Spaltung gefundenen Bruchstücke Leucin und Leu-Ser-Leu weisen auf einen "ausgefransten" C-Terminus des Hinge-Peptides hin und erklären auch den zu niedrigen Leucin-Wert in der Gesamtanalyse des Ch 210-248. Aus diesen Befunden ergibt sich die Überlappung zum T29, dessen N-Terminus mit dem isolierten Tripeptid identisch ist. Die den verschiedenen C-Termini des Hinge-Peptides entsprechenden Anschlußpeptide, Ch 249-264 bzw. 247-264, decken den weiteren Ver-

| Ch 210-248 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ch-t-210-245 | | Ch-t-246-248 | | Ch-t-246 | |
| $R_{Leu}$ | 0.0 | | 1.18 | | 1.00 | |
| $R_{Lys}$ | n.b. | | n.b. | | n.b. | |
| CM-Cys | 1.92 | (3) | | | | |
| Asx | 2.01 | (2) | | | | |
| Thr | 5.54 | (6) | | | | |
| Ser | 5.37 | (6) | 1.10 | (1) | | |
| Pro | 11.84 | (13) | | | | |
| Glx | 1.32 | (1) | | | | |
| Val | 3.32 | (3) | | | | |
| Leu | | | 1.92 | (2) | | (1) |
| His | 0.74 | (1) | | | | |
| Arg | 0.71 | (1) | | | | |
| Summe | | 36 | | 3 | | 1 |
| Hydrazino-lyse | Orn | 0.31 | | | | |

Tab.: 8

lauf des T19 ab.

Ein weiteres Cystein-haltiges Peptid, das Ch 265-268 gehört ebenfalls dem T19 an.

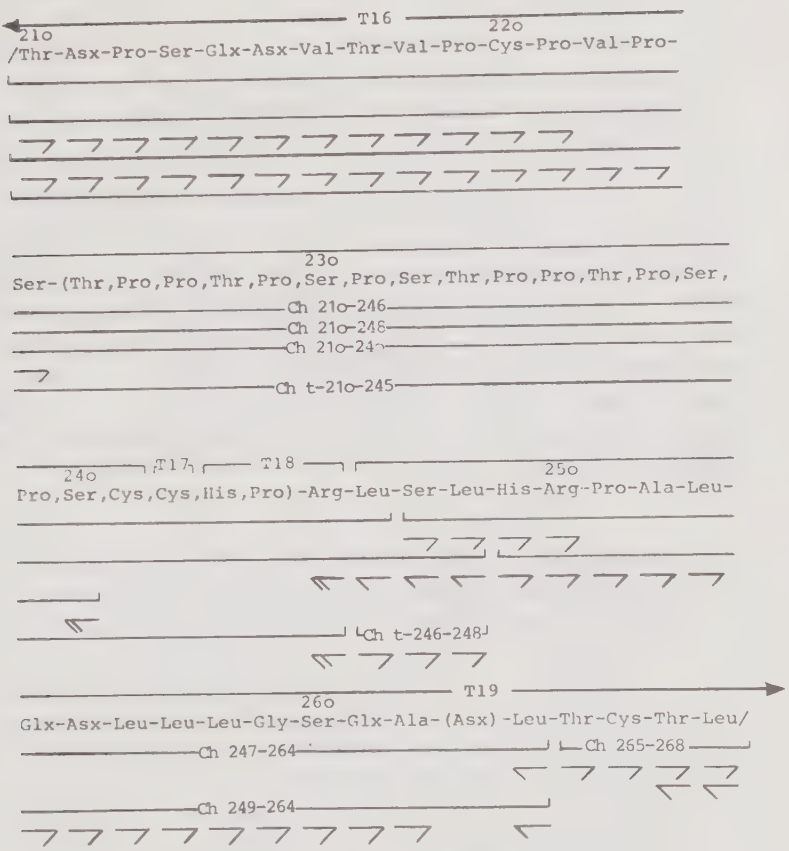



Abb. 19

Die Überlappung T19-T20 (Abb.20)

T19 besitzt C-terminal ein Arginin. Die Überlappung von diesem Bruchstück zum T20 wird durch das chymotryptische Peptid Ch 269-279 besorgt, dessen Sequenz identisch mit einem chymotryptischen Nachspaltprodukt von T19 ist. (26)

Der weitere Sequenzverlauf von Ch 269-279 läßt sich leicht als N-Terminus von T20 erkennen.

Die Überlappungen T20-T21-T22-T23-T24 (Abb.20)

Die nun folgenden 4 tryptischen Bruchstücke sind relativ kurz und lassen sich durch ein einziges chymotryptisches Peptid, das Ch 280-302, mit dem T20 verknüpfen, mit dem es acht Reste gemeinsam hat. Dieses chymotryptische Peptid umfaßt 22 Aminosäuren und ist durch ein Tryptophan, ein Lysin, ein Arginin und zwei carboxymethylierte Cystein-Reste gekennzeichnet. Sein C-Terminus lautet Tyrosin. Nach Charakterisierung des N-Terminus wurde Ch 280-302 tryptisch verdaut und die Spaltprodukte (Tab.9) über phosphorylierte Cellulose getrennt (Abb.21).

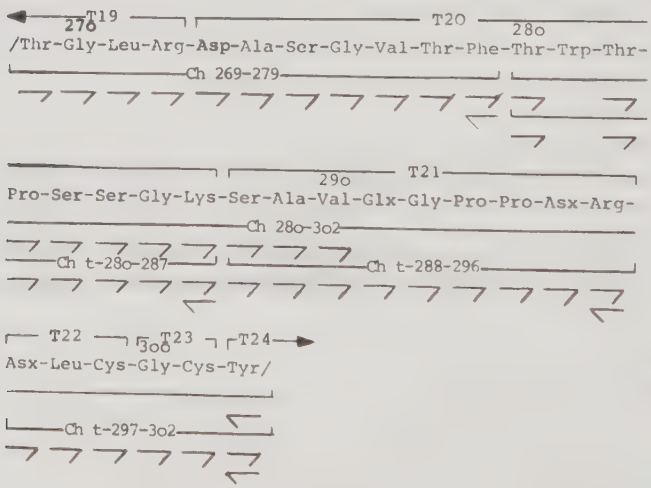



Abb.: 20

| | Ch 280-302 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ch t-280-287 | | Ch t-288-296 | | Ch t-297-302 | |
| $R_{Leu}$ | 0.27 | | 0.28 | | 0.86 | |
| $R_{Lys}$ | n.b. | | 0.03 | | -0.87 | |
| CMCys | | | | | 1.90 | (2) |
| Asx | | | 1.08 | (1) | 0.97 | (1) |
| Thr | 2.00 | (2) | | | | |
| Ser | 2.14 | (2) | 0.90 | (1) | | |
| Glx | | | 1.07 | (1) | | |
| Pro | 1.07 | (1) | 1.83 | (2) | | |
| Gly | 1.10 | (1) | 1.22 | (1) | 1.14 | (1) |
| Ala | | | 1.06 | (1) | | |
| Val | | | 1.13 | (1) | | |
| Leu | | | | | 1.00 | (1) |
| Tyr | | | | | 0.97 | (1) |
| Lys | 0.97 | (1) | | | | |
| Arg | | | 0.94 | (1) | | |
| Trp | + | (1) | | | | |
| Summe | | 8 | | 9 | | 6 |
| C'ase | Lys 0.92<br>C'ase B | | Arg 0.81<br>C'ase B | | Tyr 0.88<br>C'ase A | |

Tab. 9

Ch t-288-296 ist identisch mit T21, während Ch t-297-302 wegen der CM-Cysteine tryptisch nicht gespalten wird und daher in seiner Analyse der Summe aus T22+T23 plus des C-terminalen Tyrosins entspricht. Die Überlappung zum T24 erfolgt gerade mit diesem Tyrosin, das N-terminal unter allen tryptischen Fragmenten nur beim T24 vorkommt. Damit ist auch die Überlappung dieses Bruchstücks gesichert.

Weiterhin gehört dem T24 das chymotryptische Peptid Ch 303-308 an.

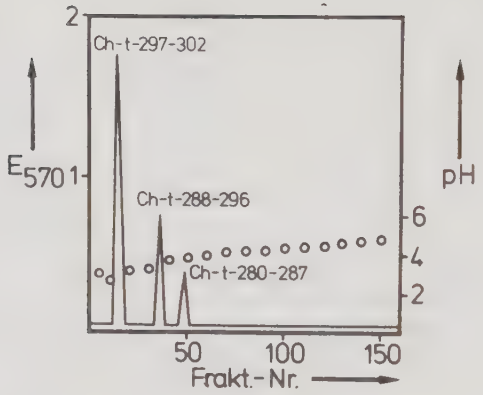



Abb.: 21 Trennung der tryptischen Nachspaltprodukte von Ch 280-302 an phosphorylierter Cellulose

Die Überlappungen T24-T25 und T25-T26 (Abb. 22)

Diese Verknüpfungen werden durch die chymotryptischen Spaltstücke Ch 309-315 und 316-321 bewirkt. Beide Überlappungen sind eindeutig und lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen Aminosäuren Cystein, Tryptophan für T24-T25 und Histidin,

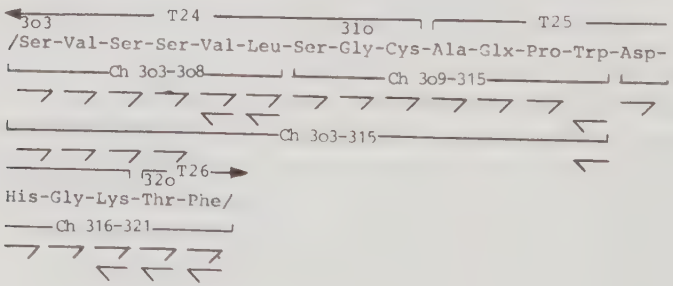



Abb.: 22

Lysin und Phenylalanin für T25-T26 leicht zuordnen. Asparaginsäure in Pos. 316 wurde durch Elektrophorese bei pH 7.8 bestimmt.

Eine noch größere Überlappung bietet ein Doppelpeptid Ch 303-315, das ebenfalls isoliert wurde.

Die Überlappungen T26-T27 und T27-T28 (Abb.23)

Ein weiteres Cystein-Peptid der Kette ist das Peptid Ch 322-334. Es ist mit einem Lysin ein echtes Überlappungspeptid, dessen im Dansyl-Edman ermittelte Sequenz in seinen ersten 12 Schritten mit der des T26 identisch ist. Bei pH 6.5 besitzt es einen $R_{Lys}$-Wert von -0.48, so daß in Pos.329 Glutaminsäure anzunehmen ist. Die auf das Lysin folgenden Reste lauten: Thr-Pro-Leu. Diese Sequenz tritt unter allen tryptischen Spaltprodukten nur beim T27 auf, einem Bruchstück, dem auch das kurze Peptid Ch 335-338 zugeordnet werden kann.

Die sich nun anschließende Verknüpfung von T27 und T28 geschieht mit einem 7 Reste umfassenden Peptid. Das C-terminale Ser-Lys aus T27 läßt sich mit dem Peptid Ch 339-345 an T28 knüpfen, wobei tryptisches und chymotryptisches Bruchstück noch 5 Reste gemeinsam haben. Elektrophoretisch konnte in Pos. 343 Asparagin bestimmt werden.

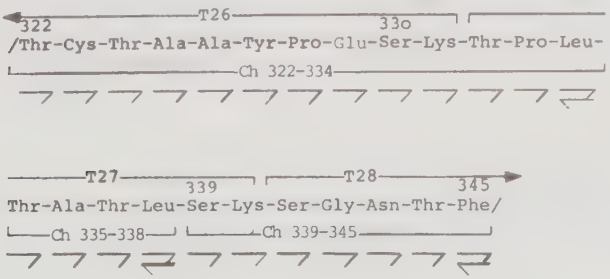



Abb.: 23

Die Überlappung T28-T29 (Abb. 24)

Dem weiteren Sequenzverlauf des T28 entspricht das Peptid Ch 346-350. Ebenso wie beim T28, das sich im Verlauf der Sequenzarbeiten als tryptisches Nebenspaltprodukt herausstellte (26), steht auch an diesem chymotryptischen Peptid Histidin C-terminal, wie durch Carboxypeptidase-Spaltung gezeigt werden konnte. Weiterhin wurde aus diesem Bereich der Kette das Bruchstück Ch 351-359 isoliert. Es stellt den N-Terminus von T29 dar. Die endgültige Überlappung

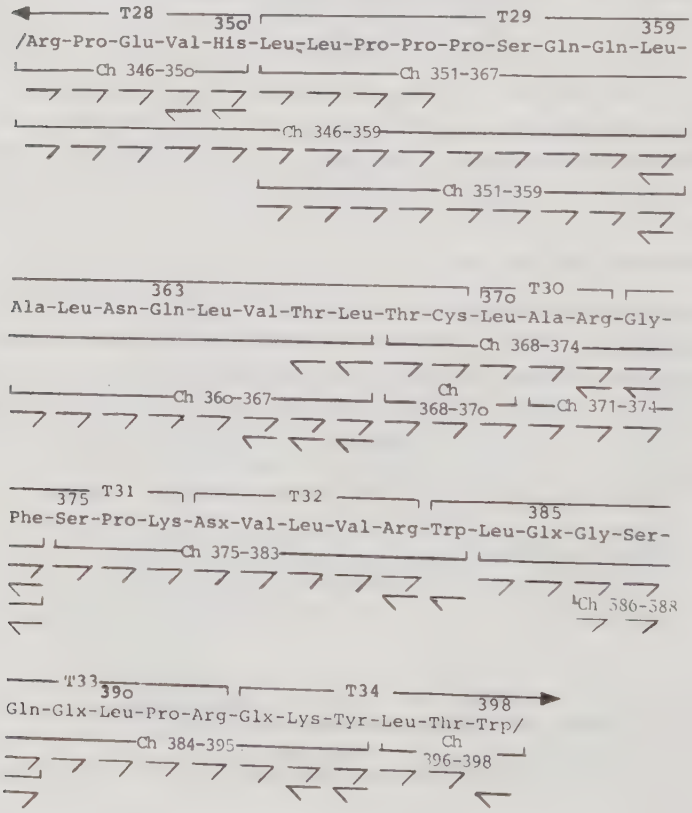



Abb.: 24

zwischen T28 und T29 ist aber erst durch die Isolierung von Ch 346-359 möglich. Das sich an dieses Bruchstück anschließende Ch 360-367 bestätigt die Sequenz des T29. Ch 351-367 schließlich stellt ein weiteres überlappendes Peptid dar. Die Amide dieses Kettenabschnittes wurden an Ch 346-350 durch Elektrophorese bei pH 7.8 (Pos. 348), alle weiteren bei pH 6.5 an den Peptiden Ch 351-359 (Pos.357,358) und Ch 360-367 (Pos. 362,363) bestimmt.

Die Überlappungen T29-T30-T31 und T31-T32-T33 (Abb.24)

Die C-terminalen Reste Thr-Cys des T29 bilden den Ausgangspunkt für das Cystein und Arginin enthaltende Ch 368-374. Dieses 7 Reste umfassende Peptid deckt gleichzeitig noch 2 Reste des darauf folgenden T31 ab. Die Dreierüberlappung T29-T30-T31 ist durch dieses chymotryptische Peptid eindeutig gelöst. Die Bruchstücke Ch 368-370 und Ch 371-374, die diesen Kettenbereich auch abdecken, wurden ebenfalls isoliert.

Weitere zwei Überlappungen werden durch das Peptid Ch 375-383 beigesteuert, das ein Lysin und ein Arginin besitzt.Bei der ersten handelt es sich um T31-T32, da der C-Terminus von T31 gleichzeitig den N-Terminus von Ch 375-383 ausmacht. Die zweite Überlappung geschieht über die C-terminale Arg-Trp-Sequenz des Ch 375-383. Ein mit Tryptophan beginnendes tryptisches Bruchstück steht mit dem T33 zur Verfügung. Der C-Terminus von Ch 375-383 ist ebenfalls durch Carboxypeptidase-Spaltung charakterisiert.

Die Überlappung T33-T34 (Abb. 24)

Das in guter Ausbeute isolierte Peptid Ch 384-395 deckt die weitere Sequenz des T33 ab und bildet mit seinen endständigen Aminosäuren Glx-Lys-Tyr eine Verknüpfung zum

T34. Das Glutamin in Pos. 388 konnte an einem kleinen Nebenspaltprodukt, Ch 386-388 elektrophoretisch bestimmt werden. Die Aminosäureanalyse dieses Peptides ist in Tab. 10 wiedergegeben.

| Gipfel | 12-4 |
|---|---|
| Ch | 386-388 |
| $R_{Leu}$ | 0.37 |
| $R_{Lys}$ | neutral |
| Ser | 0.95 (1) |
| Glx | 1.02 (1) |
| Gly | 1.02 (1) |

Tab.: 10

Dem relativ kurzen T34 gehört weiterhin das Tryptophan-Peptid Ch 396-398 an.

Die Überlappung T34-T35 (Abb.25)

Die Verknüpfung dieser beiden tryptischen Fragmente erfolgt über das chymotryptische Bruchstück Ch 399-411. Es hat mit dem T34 noch dessen endständige Sequenz Ala-Ser-Arg gemeinsam. Das Spaltstück bietet zudem den Vorteil, an diesem Peptid die Sequenz des T35 ermitteln zu können, da T35 ein zyklisiertes Glutamin N-terminal besitzt und damit dem Dansyl-Edman-Abbau nicht zugänglich ist. (26)

Der Gesamtanalyse des T35 entspricht weiterhin ein Bruchstück Ch 412-417, das auch bei der chymotryptischen Nachspaltung des T35 erhalten wird. (26). Es verbleibt noch ein restliches Arginin, das den C-Terminus des T35 bildet und die Verknüpfung zum T36 leisten muß.

Ch 399-411 zeigt elektrophoretisch bei pH 6.5 keine Mobilität. Durch eine im Anschluß an die Carboxypeptidase-Spaltung durchgeführte Hydrazinolyse konnte Glutaminsäure in Pos. 406 bestimmt werden. Damit sind auch gleichzeitig die Glutamine in Pos. 402, 403 ermittelt.

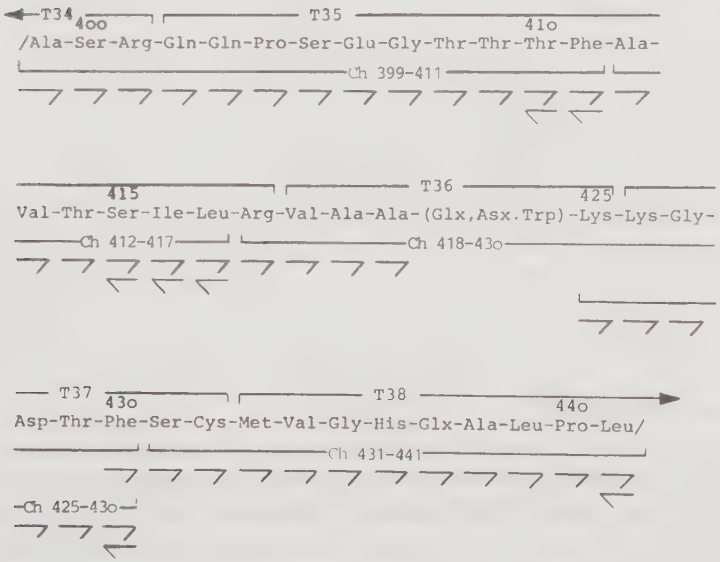



Abb.: 25

Die Überlappungen T35-T36 und T36-T37 (Abb.24)

Ein derartiges mit Arginin beginnendes chymotryptisches Peptid steht mit dem Ch 418-430 zur Verfügung. Ein weiteres mit Arginin beginnendes Peptid, Ch 19-20 scheidet aufgrund der für die Überlappung T1-T2 angeführten Überlegungen hier aus.

Wegen seiner zwei Lysin-Reste liefert Ch 418-430 außerdem noch die Überlappung von T36 und T37. Diese Überlappung läßt sich allerdings auch mit dem isolierten Bruchstück Ch 426-430 bewerkstelligen. Asparginsäure in Pos. 428 wurde an diesem Peptid durch Spaltung mit Aminopeptidase M bestimmt (Tab.11).

| Ch 425-430 | | |
|---|---|---|
| AP - M | | |
| Asp | 0.56 | (1) |
| Thr | 0.38 | (1) |
| Gly | 1.02 | (1) |
| Phe | 0.49 | (1) |
| Lys | 2.33 | (2) |

Tab. 11

Die Überlappung T37-T38 (Abb.25)

Das T37 endet in seiner Sequenz mit Ser-Cys. Ein sehr auffallendes Peptid mit dieser N-terminalen Sequenz ist das Ch 431-441, das neben diesem Cystein ein Histidin und eines der vier in der Kette vorkommenden Methione enthält. Ein tryptisches, mit Methionin in der Sequenz beginnendes und zusätzlich ein Histidin enthaltendes Peptid ist T38, dessen weitere Sequenz sich als identisch mit der für Ch 431-441 ermittelten erweist.

Ein kleines Bruchstück Ch 442-443 gehört ebenfalls dem T38 an.

Die Überlappungen T38-T39, T39-T40 (Abb.26)

Das Brückenpeptid für die Überlappung von T38 und T39 ist das Peptid Ch 444-451. Gleichzeitig ragt es noch mit einer Aminosäure in das T40 hinein und macht damit auch die Verknüpfung der bisher rekonstrukierten Kette mit diesem letzten tryptischen Peptid komplett. Ch 444-451 selbst wurde nur in geringer Ausbeute isoliert. Ein den ganzen C-Terminus der H-Kette umfassendes Bruchstück, Ch 444-472, ist Hauptprodukt der Spaltung. Die Eigenart dieses Bruchstückes und seine Reinigung wurden bereits erwähnt.

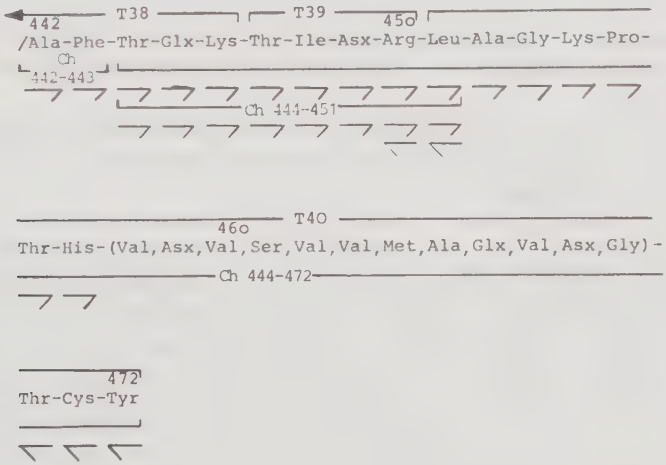



Abb.: 26

## 4. Die vollständige Aminosäuresequenz der H-Kette TRO

Die auf den vorstehenden Seiten durchgeführte Diskussion hat gezeigt, daß sich alle tryptischen Peptide anhand chymotryptischer Spaltprodukte überlappen und ihre Reihenfolge innerhalb der Polypeptidkette festlegen lassen. Darüber hinaus können auch die isolierten nichtüberlappenden chymotryptischen Peptide lückenlos der Sequenz zugeordnet werden.

Mit Hilfe von tryptischen Peptiden (26) und BrCN-Fragmenten (27) kann damit erstmals die vollständige Struktur der H-Kette eines IgA-Immunglobulins angegeben werden. Das Protein besitzt 475 Aminosäuren und insgesamt 17 Cystein-Reste.

Abb.27 gibt die vollständige Aminosäuresequenz mit den für die Überlappung verwendeten Peptiden wieder. Mit der hier beschriebenen H-Kette und der ebenfalls bereits bekannten L-Kette des IgA TRO (31) kann die Struktur des gesamten Immunglobulin-Moleküls angegeben werden (15).

Von Interesse ist ein Vergleich der hier aufgestellten Primärstruktur mit in der Literatur veröffentlichten α-Ketten-Fragmenten.

Von PUTNAM et al. (16) sind eine Reihe von Fragmenten veröffentlicht, deren exakte Lage in der Kette bislang unbekannt waren. Führt man einen Vergleich mit der vollständigen Sequenz durch, so lassen sich diese Bruchstücke zwanglos in den Pos. 171-200, 201-207, 208-245, 246-272, 297-319, 320-331 und 426-446 zuordnen. Es lassen sich jedoch einige Unterschiede in den Sequenzen feststellen. So wird von den Autoren in Pos. 309 Prolin anstelle von Serin angegeben, weiterhin Glutaminsäure statt Valin in

Pos.463, außerdem treten größere Abweichungen von Pos.315-318 auf.

Auch gegenüber den von MENDEZ et al. (18) und WOLFENSTEIN-TODEL et al. (19,20) publizierten Teilsequenzen bestehen Sequenzabweichungen. Diese Autoren führten Untersuchungen an Cys-Peptiden durch. Die Bruchstücke nehmen die folgenden Positionen in der Gesamtsequenz ein: Pos.131-140, wobei das Gesamtpeptid mit der hier ermittelten Sequenz nicht in Einklang zu bringen ist, Pos.171-200 mit einem zusätzlichen angegebenen Serin vor Pos.200, außerdem Pos. 201-207, 208-245.

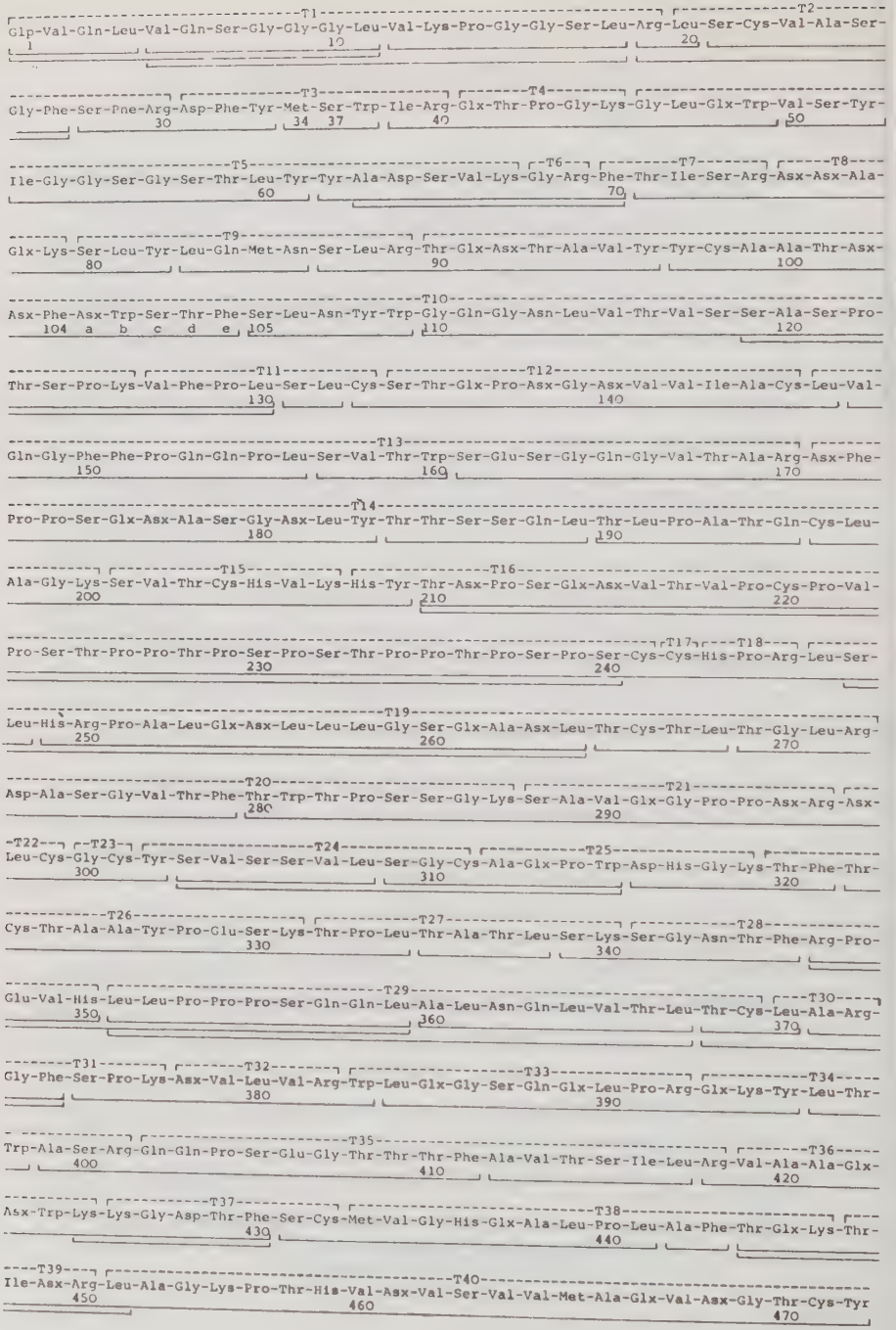
Ein weiteres Bruchstück, das den Positionen 246-272 zuzuordnen ist, wird von den Autoren größtenteils als Summenformel angegeben. Weitere Kettenbruchstücke lassen sich in Pos. 289-319, wobei in Pos. 295 ein Glx gegen ein Asx ausgetauscht ist und in Pos. 309 ein Prolin gegen ein Serin, von Pos. 315-318 mit anderer Sequenz, von Pos.320-331, von Pos. 426-446 und zu guter Letzt von Pos. 465-472 einpassen.

Auch für das C-terminale Ende der α-Kette, und zwar von Pos.433-472, liegt bereits eine Strukturformel vor, wobei in Pos. 463 ebenfalls Glutaminsäure anstelle von Valin gefunden wurde (17).

Vermutlich werden diese Unterschiede zum größten Teil technisch bedingt sein. Eine endgültige Klärung dieser Divergenzen muß zunächst abgewartet werden.

---

Abb. 27 (siehe nächste Seite) Die vollständige Aminosäuresequenz der H-Kette TRO.
Glp = Pyrrolidon-5-carbonsäure.


T1
T2
Glp-Val-Gln-Leu-Val-Gln-Ser-Gly-Gly-Gly-Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Gly-Ser-Leu-Arg-Leu-Ser-Cys-Val-Ala-Ser-
1
10
20
T3
T4
Gly-Phe-Ser-Phe-Arg-Asp-Phe-Tyr-Met-Ser-Trp-Ile-Arg-Glx-Thr-Pro-Gly-Lys-Gly-Leu-Glx-Trp-Val-Ser-Tyr-
30
34 37
40
50
T5
T6
T7
T8
Ile-Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Thr-Leu-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly-Arg-Phe-Thr-Ile-Ser-Arg-Asx-Asx-Ala-
60
70
T9
Glx-Lys-Ser-Leu-Tyr-Leu-Gln-Met-Asn-Ser-Leu-Arg-Thr-Glx-Asx-Thr-Ala-Val-Tyr-Tyr-Cys-Ala-Ala-Thr-Asx-
80
90
100
T10
Asx-Phe-Asx-Trp-Ser-Thr-Phe-Ser-Leu-Asn-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Asn-Leu-Val-Thr-Val-Ser-Ser-Ala-Ser-Pro-
104 a b c d e 105
110
120
T11
T12
Thr-Ser-Pro-Lys-Val-Phe-Pro-Leu-Ser-Leu-Cys-Ser-Thr-Glx-Pro-Asx-Gly-Asx-Val-Val-Ile-Ala-Cys-Leu-Val-
130
140
T13
Gln-Gly-Phe-Phe-Pro-Gln-Gln-Pro-Leu-Ser-Val-Thr-Trp-Ser-Glu-Ser-Gly-Gln-Gly-Val-Thr-Ala-Arg-Asx-Phe-
150
160
170
T14
Pro-Pro-Ser-Glx-Asx-Ala-Ser-Gly-Asx-Leu-Tyr-Thr-Thr-Ser-Ser-Gln-Leu-Thr-Leu-Pro-Ala-Thr-Gln-Cys-Leu-
180
190
T15
T16
Ala-Gly-Lys-Ser-Val-Thr-Cys-His-Val-Lys-His-Tyr-Thr-Asx-Pro-Ser-Glx-Asx-Val-Thr-Val-Pro-Cys-Pro-Val-
200
210
220
T17
T18
Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys-Cys-His-Pro-Arg-Leu-Ser-
230
240
T19
Leu-His-Arg-Pro-Ala-Leu-Glx-Asx-Leu-Leu-Leu-Gly-Ser-Glx-Ala-Asx-Leu-Thr-Cys-Thr-Leu-Thr-Gly-Leu-Arg-
250
260
270
T20
T21
Asp-Ala-Ser-Gly-Val-Thr-Phe-Thr-Trp-Thr-Pro-Ser-Ser-Gly-Lys-Ser-Ala-Val-Glx-Gly-Pro-Pro-Asx-Arg-Asx-
280
290
T22
T23
T24
T25
Leu-Cys-Gly-Cys-Tyr-Ser-Val-Ser-Ser-Val-Leu-Ser-Gly-Cys-Ala-Glx-Pro-Trp-Asp-His-Gly-Lys-Thr-Phe-Thr-
300
310
320
T26
T27
T28
Cys-Thr-Ala-Ala-Tyr-Pro-Glu-Ser-Lys-Thr-Pro-Leu-Thr-Ala-Thr-Leu-Ser-Lys-Ser-Gly-Asn-Thr-Phe-Arg-Pro-
330
340
T29
T30
Glu-Val-His-Leu-Leu-Pro-Pro-Pro-Ser-Gln-Gln-Leu-Ala-Leu-Asn-Gln-Leu-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Leu-Ala-Arg-
350
360
370
T31
T32
T33
T34
Gly-Phe-Ser-Pro-Lys-Asx-Val-Leu-Val-Arg-Trp-Leu-Glx-Gly-Ser-Gln-Glx-Leu-Pro-Arg-Glx-Lys-Tyr-Leu-Thr-
380
390
T35
T36
Trp-Ala-Ser-Arg-Gln-Gln-Pro-Ser-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Phe-Ala-Val-Thr-Ser-Ile-Leu-Arg-Val-Ala-Ala-Glx-
400
410
420
T37
T38
Asx-Trp-Lys-Lys-Gly-Asp-Thr-Phe-Ser-Cys-Met-Val-Gly-His-Glx-Ala-Leu-Pro-Leu-Ala-Phe-Thr-Glx-Lys-Thr-
430
440
T39
T40
Ile-Asx-Arg-Leu-Ala-Gly-Lys-Pro-Thr-His-Val-Asx-Val-Ser-Val-Val-Met-Ala-Glx-Val-Asx-Gly-Thr-Cys-Tyr
450
460
470

## D. Diskussion

### 1. Kettenvergleich der α-Kette TRO mit anderen H-Ketten

Für Kettenvergleiche an H-Ketten standen bisher die Sequenzdaten von insgesamt 4 vollständig bekannten Proteinen zur Verfügung. Es handelt sich um zwei Ketten vom $\gamma_1$-Typ (Protein EU (10), Protein NIE (11)), einer μ-Kette, (Protein GAL (13)) und einer ε-Kette (Protein ND (12)).

Die α-Kette TRO ist der erste bekannte Vertreter eines weiteren H-Ketten-Typs (15). Die Sequenzdaten sind erst kürzlich durch Arbeiten von PUTNAM et al. (16), die den C-Teil einer anderen α-Kette untersuchten, für diesen Kettenabschnitt bestätigt worden.

Die α-Kette TRO umfaßt insgesamt 475 Aminosäuren und liegt damit in ihrer Länge zwischen den $\gamma_1$- (448 Reste (11)) und den μ-Ketten (571 Reste (13)).

Der variable Teil der Kette reicht von Pos. 1-119 und enthält 122 Aminosäuren, während der konstante Teil die Reste 120-472 besitzt.

Entsprechend dieser Zweiteilung des Moleküls sollen Besprechung und Kettenvergleich für den variablen und den konstanten Teil getrennt erfolgen.

#### 1.1. Der Variable Teil

Die Spezifität eines Antikörpers wird durch die variablen Teile der beteiligten Ketten bestimmt (5).

Aminosäuresequenzen von Immunglobulinketten, sowohl von L- als auch von H-Ketten, bieten daher die Möglichkeit, erstmals zwei Fragen auf molekularer Ebene anzugehen:

1. Was ist die Grundlage der Spezifität, d.h. welche Abschnitte der V-Teile beteiligen sich an der Haftstelle des Antikörpers, die zum Antigen eine komplementäre Struktur haben muß ?

2. Sind die Aminosäureaustausche, die in den V-Teilen aller Kettentypen beobachtet werden, genetisch bedingt oder nicht, d.h., ist die Antikörperspezifität eine erworbene Eigenschaft des immunkompetenten Systems oder nicht ?

Abbildung 28 gibt eine Zusammenfassung aller bekannten V-Teile von H-Ketten wieder (57). Die Anordnung der Ketten erfolgt nach Kriterien der maximalen Homologie, d.h., homologe Reste stehen in identischen Positionen. Die unterschiedlichen Kettenlängen müssen daher durch "Lücken" ausgeglichen werden.

Die Analyse dieser Ketten in horizontaler und vertikaler Richtung lassen einige Regeln über den Aufbau der Immunglobuline erkennen, die zur Beantwortung der beiden Fragen bedeutsam sind.

Bei vertikaler Betrachtung der einzelnen Positionen fällt auf, daß die Aminosäureaustausche und Deletionen, die die Variabilität dieses Kettenabschnitts bedingen, nicht gleichmäßig über den variablen Teil verteilt sind. Es lassen sich eine ganze Reihe von Positionen erkennen, in denen alle bisher untersuchten Ketten eine identische Struktur aufweisen. So zum Beispiel in den Positionen 2, 4, 8, 14, 22, 25, 26, 38, 40, 43, 44, 47-49, 69, 94, 96, 98, 112, 115, 117 und 118. Diese Anzahl der konstanten Reste wird vermutlich geringer werden, wenn mehr Ketten

Abb. 28 Vergleich der bisher bekannten variablen Teile menschlicher H-Ketten. Nach (57).

untersucht sind. Sicher werden jedoch die beiden Cystein-Reste in Position 22 und 98 konstant bleiben. Es handelt sich hier um diejenigen Cysteinreste, die in allen Ketten eine intrapeptidale Disulfidbrücke herstellen und die damit für die Ausbildung einer Schleife von etwa 55-70 Resten im variablen Teil verantwortlich sind.

Neben diesen konstanten Resten fallen außerdem auch weitere Positionen bzw. Kettenabschnitte auf, bei denen eine erhöhte Variabilität auftritt. Die Variabilität kann durch den Ausdruck

$$V = \frac{(\Sigma \text{ verschiedene Aminosäuren} - 1) \times (\Sigma \text{ Proteine})^2}{\Sigma \text{ (gleiche Aminosäuren)}^2}$$

definiert werden (58). In dieser Formel findet sowohl die Anzahl der verschiedenen Aminosäuren als auch die Häufigkeit ihres Auftretens innerhalb einer Spalte Berücksichtigung.

In Abb. 29 ist das Ergebnis dieser Berechnung graphisch wiedergegeben. Es zeigt sich, daß insbesondere 3 Bereiche, nämlich die Sequenzabschnitte von Pos. 31-37, Pos. 53-64, Pos. 101-105 eine erhöhte Variabilität aufweisen, ein vierter Bereich von Pos. 85-90 deutet sich an. Die beobachtete Variabilität in diesen Abschnitten ist nicht nur durch Aminosäureaustausche bedingt, sondern auch durch die in den Positionen 35, 36 bzw. 104a-104h auftretenden Deletionen.

Diese drei hypervariablen Abschnitte wurden in homologen Positionen bereits bei den L-Ketten vom κ- und λ-Typ beschrieben (59,60). Es handelt sich dabei also um ein allgemeines Strukturprinzip, das sich nun bei den H-Ketten wiederholt. Auf den vierten Bereich bei den H-Ketten wurde erstmals von CAPRA et al. (14) hingewiesen.

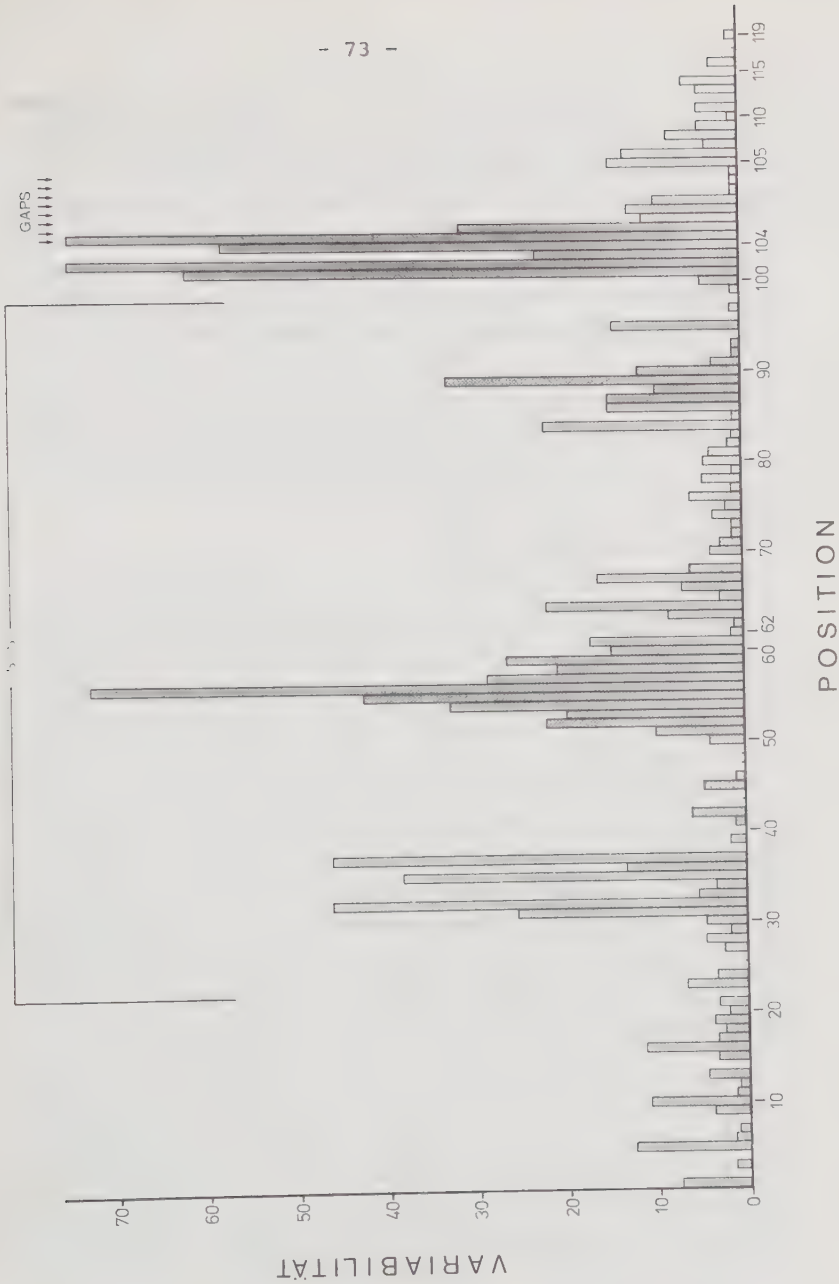



Abb. 29 Variabilitäts-Berechnung der in Abb. 28 aufgeführten H-Ketten V-Teile. Definition siehe Text.

Zwischen der Aminosäuresequenz der variablen Abschnitte und der Spezifität des Antikörpermoleküls besteht ein ursächlicher Zusammenhang (5). Da die Haftstelle nach KABAT (61) nur etwa 3% der Antikörperoberfläche einnimmt, kann sich an der Ausbildung der Haftstelle nicht der ganze variable Abschnitt beteiligen, sondern es ist anzunehmen, daß ähnlich dem aktiven Zentrum der Enzyme, nur einzelne Kettenabschnitte hierfür zur Verfügung stehen (5).

Das hier vorgestellte Protein TRO kann, ähnlich wie die anderen Proteine der Abb.28 zur Klärung dieser Frage nur einen indirekten Beitrag leisten, da es sich in allen Fällen um Myelomproteine handelt, bei denen das zugehörige Antigen nicht bekannt ist.

Es konnte jedoch aus Strukturvergleichen ermittelt werden, daß gerade die hypervariablen Abschnitte der L- und H-Ketten die Haftstelle bilden und somit die Spezifität der Antikörper bestimmen. Diese Vermutung hat sich durch Affinitätsmarkierungsexperimente (62-64) und mehr noch durch röntgenkristallographische Untersuchungen von F(ab)-Fragmenten (65), L-Ketten-Dimeren (66) und V-Teil-Dimeren (67) bestätigt. Die Haftstelle hat nach diesen Untersuchungen eine trichterförmige Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 15 Å und unterschiedlicher Tiefe. Die Wandung der Haftstelle wird ausgekleidet von den Aminosäure-Seitenketten der 3 hypervariablen Regionen der L- und H-Ketten. Der bei den H-Ketten entdeckte 4.hypervariable Bereich nimmt daran jedoch nicht teil.

Die horizontale Betrachtung der in Abb.28 zusammengestellten Ketten ergibt eine andere Regel, die für das Verständnis der Entstehung der Antikörpervariabilität von Bedeutung ist. Es fällt auf, daß die Aminosäureaustausche und Deletionen der V-Teile keineswegs zufällig auftreten, sondern gekoppelt

sind. Beginnt z.B. eine Kette N-terminal mit der Aminosäure Glutaminsäure, so werden in der Regel in den Positionen 9 und 10 Glycin, in den Positionen 13 Glutamin, 16 Glycin, 19 Arginin usf. gefunden. Aufgrund dieser gekoppelten Aminosäureaustausche lassen sich die variablen Teile in sogen. Subgruppen einteilen, die in Abb.28 mit I-III gekennzeichnet sind (68-73). Die subgruppenspezifischen Aminosäureaustausche sind in Abb.28 durch dünne schwarze Umrandungen hervorgehoben, wobei mit der Subgruppe II auch die Insertion in Pos.35 und 36 einhergeht. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ist das Protein TRO eindeutig in die Subgruppe III einzuordnen.

Die unterschiedlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Ketten werden durch die Subgruppeneinteilung insofern noch hervorgehoben, als innerhalb einer Subgruppe die Proteine eine weit geringere Austauschrate aufweisen (bis 41%) als wenn Proteine unterschiedlicher Subgruppen miteinander verglichen werden (bis 72%) (74).

Das Auftreten der Subgruppen ist nicht allein auf die H-Ketten beschränkt, sondern ist auch bei den L-Ketten vom κ- und λ-Typ zu beobachten. Es stellt somit ebenfalls ein allgemeines Ordnungsprinzip der Immunglobulin-Ketten dar. Die Ordnungsmuster sind bei den einzelnen Kettentypen zwar verschieden, aber qualitativ und phänomenologisch sind sie gleich. Für κ-Ketten sind 4, und für λ-Ketten ebenfalls 4 solcher Subgruppen bekannt (75-80). Zu einer weiteren Differenzierung in Untersubgruppen, wie es bei den L-Ketten möglich ist (81-83), existieren bei den H-Ketten bislang zu wenig Daten.

Aminosäureaustausche, die sich bislang nicht in das Subgruppenschema einfügen lassen, sind in Abb.28 durch dicke schwarze Umrandungen hervorgehoben. Diese Austausche treten gehäuft in den hypervariablen Abschnitten auf.

## 1.2. Genetische Interpretation der Variabilität

Alle bisher verfügbaren Sequenzdaten von Immunglobulinketten stammen von Proteinen verschiedener Individuen. Die trotzdem durch den Sequenzvergleich entdeckten Ordnungsprinzipien der gekoppelten Aminosäureaustausche und Deletionen sind nur durch eine evolutionäre Entstehung der Antikörpervariabilität erklärbar (84-86). Ein solcher Entstehungsmechanismus zeigt alle Merkmale, wie sie auch von der Evolution anderer Proteine, wie z.B. der Cytochrome (87) und der Hämoglobuline (88) her bekannt sind.

Ein derartiges Modell schlägt vor, daß in der Entwicklungsgeschichte, d.h. vor 300-400 Millionen Jahren, zunächst nur ein Ur-V-Gen vorhanden gewesen ist, aus dem sich durch wiederholte Genduplikation und nachfolgende unabhängige Mutation alle anderen V-Ketten-Gene abgeleitet haben. Die einmal erfolgten Mutationen und Deletionen werden bei der weiteren Duplikation in alle nachfolgenden Kopien übertragen und drücken sich dort als subgruppenspezifische Reste in der Proteinstruktur aus. Die nicht gekoppelten Aminosäureaustausche der Abb.28 sind demnach Ketten, für die wegen der außerordentlich geringen Strukturdaten (nur 1% der vorhandenen Sequenzen sind bekannt) Kopplungen noch nicht gefunden wurden, oder es handelt sich um solche Reste, die entwicklungsgeschichtlich noch so neu sind, daß für sie noch keine Kopplungen bestehen (5).

Die Schlußfolgerungen aus dieser genetischen Interpretation der Sequenzdaten ist die, daß im Genom ein ganzer Satz von V-Genen existieren muß, die durch Genduplikation und nachfolgende Mutation entstanden sind. Solcherart serienmäßig duplizierte Gene für die große Zahl von

V-Teilen in jedem Individuum sind für andere Systeme in der Natur bekannt. Sie wurden zu einem hohen Prozentsatz im Säugetiergenom gefunden, manchmal bis zu 30 bis 40% des DNS-Gehalts (89).

Inzwischen können durch Hybridisierungsexperimente mit gereinigter mRNS für Mäuse-Immunglobulinketten auch direkte Angaben über die Anzahl von V-Genen gemacht werden, die jedem Kettentyp zur Verfügung stehen (90). Für die Maus sind nach diesen Autoren 2500-5000 V-Gene pro Kettentyp vorhanden. Diese Angaben sind jedoch nicht unwidersprochen geblieben (91).

Für die H-Ketten ergibt sich bei der Betrachtung der Abb.28 eine Besonderheit. Die Subgruppen und Austauschmuster sind im Gegensatz zu den κ- und λ-Ketten vom Kettentyp abhängig. Das bedeutet, daß alle H-Ketten denselben Satz von variablen Genen benutzen, bzw. das ein und derselbe Satz von V-Genen mit den konstanten Genen der H-Ketten gepaart auftreten kann (92). Entsprechende Proteine, die verschiedene C-Teile aber identische V-Teile zu besitzen scheinen, wurden bereits isoliert (93,94).

Folglich gibt es im Genom drei V-Gen-Sätze: einen für die κ-, einen für die λ- und einen für die H-Ketten.

Im nachfolgenden Kapitel soll gezeigt werden, daß eine Vielzahl von Genen nur für die variablen Teile notwendig sind. Für den kostanten Teil einer Kette gilt dies nicht. Hier ist das C-Gen nur einmal vorhanden.

## 1.3. Der konstante Kettenabschnitt

Der Kettentyp jeder Immunglobulinkette wird durch den konstanten Abschnitt festgelegt, der eine jeweils charakteristische Sequenz besitzt.

Der Übergang vom variablen zum konstanten Abschnitt erfolgt bei der α-Kette in Pos. 119. Im Gegensatz zum Threonin der μ-Kette steht bei der α-Kette ein Serin in dieser Position.

Der C-Teil der α-Kette besitzt 353 Aminosäuren. Vergleicht man die konstante Sequenz der Kette abschnittsweise mit sich selbst, so läßt sich ähnlich den $\gamma_1$- und μ-Ketten auch bei der α-Kette eine interne Homologie erkennen. Im Gegensatz zur μ-Kette GAL und zur ε-Kette ND, die je vier Homologieregionen besitzen, zeigt die α-Kette, wie auch die $\gamma_1$-Kette, nur drei solcher Regionen. Die Länge von etwa 105 Resten pro Region entspricht dabei etwa der Länge der L-Ketten V- und C-Teile.

Abb.30 gibt eine Aufstellung der Homologieregionen von $\gamma_1$, $\alpha_1$, μ und ε-Kette wieder. Zum Vergleich sind ebenfalls die C-Teile von κ- und λ-Ketten in dieser Aufstellung angeführt. Die Ketten sind so angeordnet, daß homologe Reste in identischen Positionen stehen und eine möglichst geringe Anzahl von Deletionen auftritt. Bei der Betrachtung fällt auf, daß die einzelnen Homologieregionen der Ketten nicht nur untereinander sondern auch zu den übrigen Ketten einen beachtlichen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Am augenscheinlichsten wird dieses bei der Anordnung der Cystein-Reste. Alle Homologieregionen besitzen jeweils eine intrapeptidale Disulfidbrücke, die zu einer Schleifenbildung von etwa 60 Aminosäuren in jeder Homologie-

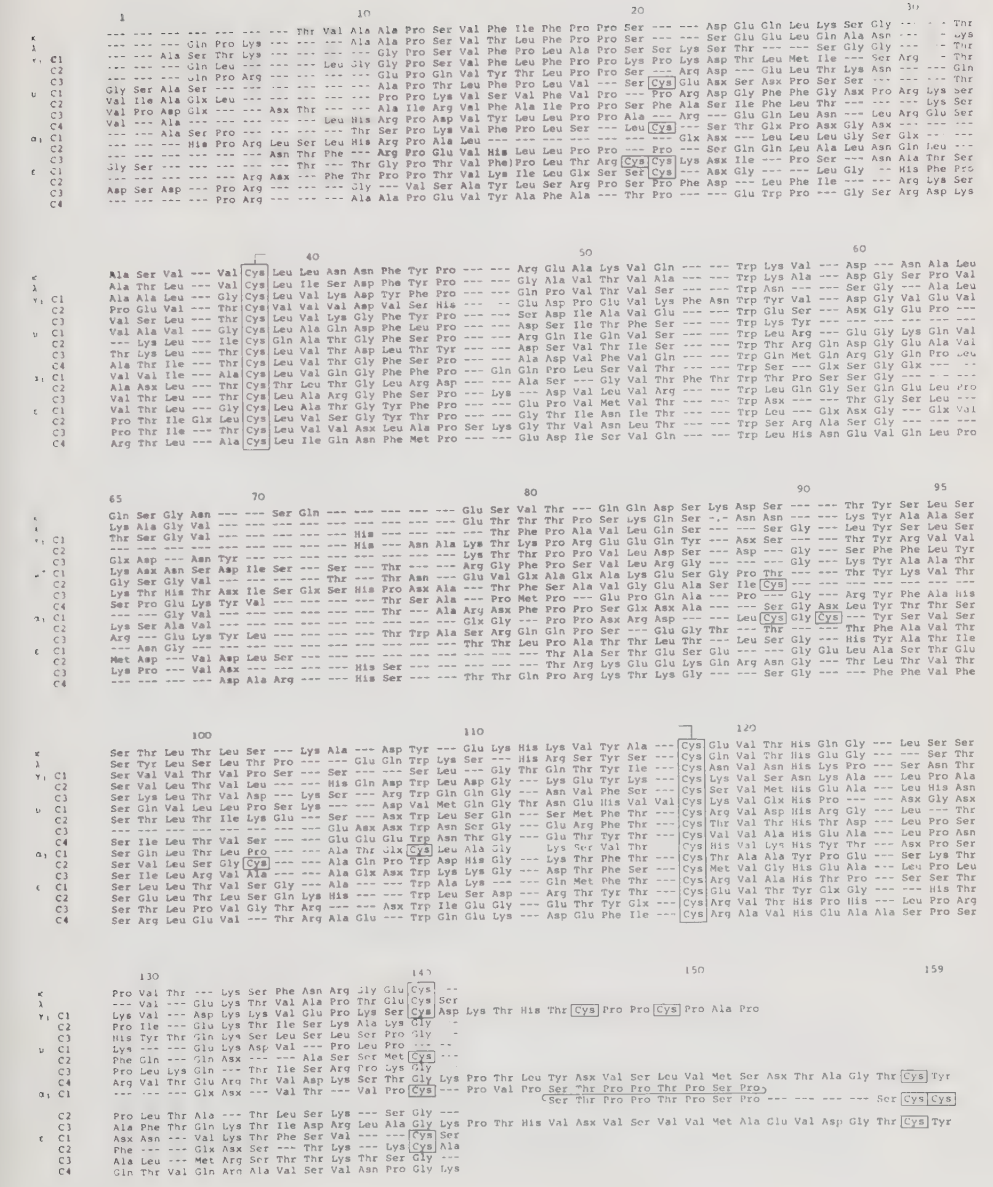


Abb. 30 Strukturvergleich der konstanten Sequenzen der L-Ketten vom κ- und λ-Typ und der bisher bekannten H-Ketten.

region führt. Für die α-Kette bilden anscheinend die Cystein-Reste 4 (Pos. 145) und 6 (Pos.204), 10 (Pos.266) und 14 (Pos.323), 15 (Pos.369) und 16 (Pos.432) diese Verknüpfungen.

Zur Klärung der weiteren Cystin-Brücken in der α-Kette sind Untersuchungen im Gange (95).

Aus der Abb.30 ergeben sich für die α-Kette zwei strukturelle Besonderheiten:
Zunächst fällt auf, daß die α-Kette beim Übergang von der 1. zur 2.Homologieregion (im folgenden mit C1, C2, usw. bezeichnet) eine Insertion, entsprechend den Positionen 218 bis 242, aufweist. Dieser Bereich bildet den bereits bei der Diskussion der Überlappungen erwähnten sogenannten Hinge. Auch bei der $\gamma_1$-Kette ist ein derartiger, allerdings eine geringere Anzahl von Resten umfassender, Einschub zwischen C1 und C2 festzustellen. Die dort lokalisierten Cystein-Reste bilden interpeptidale H-H-Disulfidbrücken (74). Hingegen besitzen μ- und ε-Ketten keinen Hinge-Bereich. Auf die Entstehung der Hinge-Region und auf ihren möglichen genetischen Mechanismus im Verlauf der Evolution der Antikörper soll im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen werden.

Eine zweite Besonderheit der α-Kette stellt ein 18 Reste umfassender zusätzlicher Sequenzabschnitt im Anschluß an die C3-Region dar. Diese zusätzlichen 18 Reste sind auch bei der μ-Kette im Anschluß an die C4-Region bekannt (13). Beide Sequenzen zeigen große Ähnlichkeit.

### 1.4. Genetische Interpretation des konstanten Kettenabschnittes

Die bisher durch den Sequenzvergleich aufgedeckten Strukturunterschiede haben bemerkenswerte Regelmäßigkeiten

bezüglich der Länge der einzelnen Kettenabschnitte aufgezeigt. Die einzelnen Kettentypen unterscheiden sich wesentlich durch die Länge ihrer C-Teile (Abb.31), die auf jeweils Vielfache einer Grundlänge zurückzuführen sind, und durch die charakteristische Sequenz dieses Kettenabschnitts. Auf diese Kettenvielfalt baut der Polymorphismus der Immunglobuline auf.

Die Form der Homologie und die Verwandtschaftsverhältnisse der Ketten untereinander sprechen eindeutig für eine evolutionäre Entwicklung aller konstanten Teile aus einer Ur-C-Kette von der Länge eines L-Ketten C-Teils (96,97).

Ein Modell dieser Art schlägt vor, daß zunächst zwei Gene für L- und H-Ketten aus diesem Ur-C-Gen hervorgegangen sind. Das C-Gen der Ur-H-Kette hat sich anschließend durch Genduplikation und Fusion um die Faktoren 2, 3 und 4 verlängert. Aus den Sequenzdaten ergibt sich, daß erst nach dieser Verlängerung durch Punktmutationen eine Aufspaltung in verschiedene C-Gene erfolgte (5). Da die Immunglobuline niederer Wirbeltiere IgM-ähnlich sind, dürfte der C-Teil der Ur-H-Kette aus vier Homologieregionen bestanden haben. Die α-Kette ist also möglicherweise durch Verlust einer Homologieregion aus der Ur-H-Kette entstanden.

Die Aufteilung des Ur-L-Ketten-C-Teiles in C-Teile für κ- und λ-Ketten scheint dagegen jüngeren Datums zu sein.

Aus den Strukturdaten aller Kettentypen läßt sich ableiten, wieviele Gene für die C-Teile der Immunglobulinketten jetzt vorhanden sind.

Danach ist bei den κ-Ketten nur ein Gen pro Haploid vorhanden, daß sich in den beiden allelen Formen serologisch als Inv $a^+$ und Inv $b^+$ zu erkennen gibt (96). Für die L-Ketten existieren Gene für $C_{\lambda 1}$, $C_{\lambda 2}$ und $C_{\lambda 3}$ (99), während es bei den H-Ketten für jeden Kettentyp ein Gen geben muß.

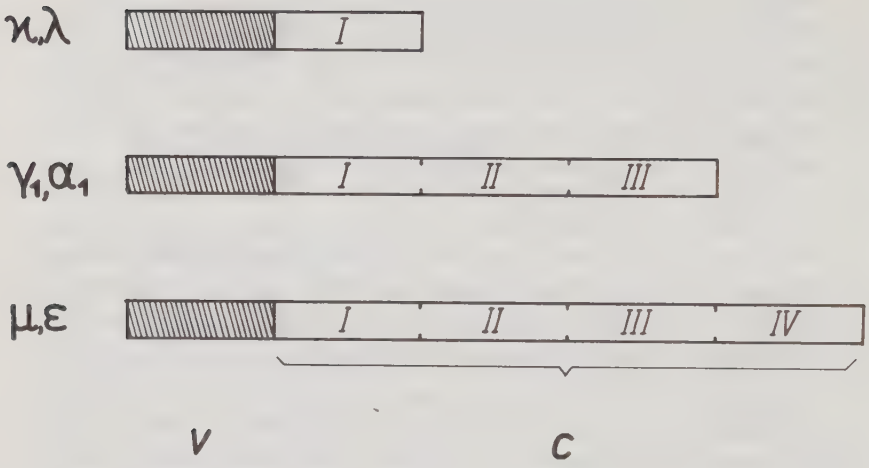



Abb. 30 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Längen des konstanten Teiles von menschlichen Immunglobulin-Ketten.

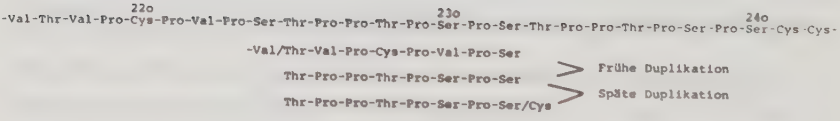



Abb. 31 Homologien an der Hinge-Region von α-Ketten

Einen Sonderfall im oben genannten Prinzip der vollständigen Genverdoppelung zur Erklärung der verschiedenen C-Teile stellen die Hinge-Region der $\alpha_1$-Kette und die C-terminalen 18 Reste in $\alpha_1$- und $\mu$-Kette dar.

Die Hinge-Region der $\alpha_1$-Kette kann mit einem Mechanismus der zweifachen partiellen Genduplikation erklärt werden (100). Zunächst hat sich der den C-terminalen Abschnitt der C1-Region kodierende Genbereich in einer Länge von 8 Aminosäuren verdoppelt. Der neu entstandene Sequenzabschnitt wurde einer weiteren Verdoppelung unterworfen, so daß sich insgesamt ein Einschub von 22 Resten zwischen C1 und C2-Regionen ergibt. In Abb.32 ist der genetische Vorgang dargestellt. Die an diesem Abschnitt der Kette beobachteten Homologien lassen außerdem eine Aussage darüber zu, wann im Laufe der Evolution diese beiden Ereignisse stattgefunden haben (100). Bei der letzten Duplikation handelt es sich vermutlich um ein junges Ereignis, denn die homologen Bereiche sind (noch) identisch. Punktmutationen sind diesem Vorgang noch nicht überlagert.

Die erste Duplikation dagegen ist älteren Datums, denn die duplizierten Bereiche sind zwar noch homolog aber nicht mehr identisch.

## 2. Antikörperproblem und Differenzierung

Die beschriebenen strukturellen Eigenschaften der V- und C-Teile und ihre genetische Interpretation im Sinne einer evolutionären Entstehung ergeben als Konsequenz eine getrennt genetische Kontrolle dieser Kettenbereiche.

Abb.33 faßt die Kenntnisse über die Zahl der Gene bzw. Gensätze der V- und der C-Teile zusammen. Jeweils ein V-Gen und ein C-Gen sind für die Synthese einer Immunglobulinkette verantwortlich.

Diese getrennt genetische Kontrolle des variablen und konstanten Teiles der Ketten ist neu und ungewöhnlich. Sie weicht sowohl vom klassischen "ein-Gen-ein-Protein"-Dogma (101) als auch vom Prinzip des "viele-Gene-ein-Protein", wie es für die Proteinklasse der Histone formuliert wurde (102), ab. Da im gemeinsamen Genprodukt, der Immunglobulinkette, V- und C-Teil vereint sind, stellt sich die Frage des Zusammenwirkens dieser beiden Gene. Ein Fusionsprozess ist zwangsläufig erforderlich. Dieser Vorgang kann prinzipiell auf drei verschiedenen Ebenen stattfinden.

1. Auf Proteinebene, nach getrennter Synthese von V- und C-Teil.
2. Auf mRNS-Ebene, nach getrennter Synthese von mRNS's für V- und C-Teil.
3. Auf DNS-Ebene.

Die erste Möglichkeit ist ausgeschlossen, da in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß die Proteinbiosynthese der Ketten, und zwar der V- und C-Teile, am Ribosom in einem Stück erfolgt (103,104).

Abb. 33 Schematische Zusammenfassung über die Zahl der Gene bzw. Gensätze, die die variablen- und konstanten Teile der Immunglobulin-Ketten kodieren.

Auch die zweite Möglichkeit ließ sich experimentell nicht bestätigen, da isolierte mRNS's immer ganze Immunglobulinketten kodieren (105). Sequenzuntersuchungen an diesen mRNS's (106) und Translationsversuche in zellfreien Systemen sind erfolgreich durchgeführt worden (107).

Die Möglichkeit der Fusionierung auf DNS-Ebene ist dagegen wahrscheinlich. Ein wichtiger Hinweis zur Bestätigung dieser Hypothese erfolgt durch die Untersuchung von sogenannten H-Chain-Desease-Proteinen. Diese Myelomproteine besitzen Molekulargewichte, die wesentlich geringer als üblich sind. Das geringere Molekulargewicht wird durch eine Deletion in der Aminosäuresequenz der H-Ketten bedingt (108). Die Deletion umfaßt einen größeren Kettenbereich, dem immer sowohl V- und C-Teil als auch die Nahtstelle zwischen diesen beiden Abschnitten angehören. Da der H-Chain-Desease erst nach der Differenzierung der Zelle zur Antikörper-bildenden Plasmazelle auftritt, müssen die Gene für die V- und C-Teile bereits vorher auf DNS-Ebene fusioniert worden sein (109).

Der Vorgang der Fusion ist am Beginn der Differenzierung der Antikörper-produzierenden Plasmazelle anzunehmen (5). Die dieser Zelle vorausgehende Stammzelle ist multipotent und besitzt noch die Möglichkeit, $10^6$ verschiedene Antikörper mit verschiedenen Spezifitäten synthetisieren zu können . Die Plasmazelle selbst hingegen ist nur noch in der Lage, einen Antikörper bestimmter Spezifität zu synthetisieren (5).

Durch Fusion des C-Genes mit einem Gen aus dem Satz von V-Genen wird festgelegt, welches V-Gen aktiviert wird und welche Spezifität der Antikörper erhält. Dieser Vorgang der Gentranslokation und Fusion differenziert die Stammzelle in eine unipotente Plasmazelle. Er geschieht ohne Beteiligung eines Antigens (57) und ist daher nicht

gerichtet. Dadurch wird sichergestellt, daß jede Zelle nur eine Spezifität von Antikörpern produziert aber eine große Anzahl verschiedener Antikörper vorhanden ist, bzw. synthetisiert werden können.

Das Immunsystem stellt damit ein geeignetes Modellsystem dar, an dem Differenzierungsvorgänge von Zellen studiert werden können.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen einer vollständigen Strukturbestimmung eines IgA(1)-Myelomproteins durchgeführt worden.

Im einzelnen wird über die Reinigung der H- und L-Ketten des Proteins und die Charakterisierung der H-Kette berichtet. Die nach chymotryptischer Spaltung dieser Kette erhaltenen Peptide sind mit verschiedenen peptidchemischen Methoden isoliert und gereinigt.

Die Aminosäureanalysen aller chymotryptischen Peptide der α-Kette werden angegeben. An diesen Peptiden sind zahlreiche Sequenzarbeiten durchgeführt worden.

Mit Hilfe der chymotryptischen Peptide lassen sich die vorliegenden tryptischen Peptide anordnen. Die Überlappungen werden diskutiert und die Gesamtstruktur der α-Kette rekonstruiert.

Die Kette umfaßt 475 Aminosäuren und besitzt 17 Cystein-Reste. Ein Vergleich mit dem bestehenden Subgruppenschema der H-Ketten zeigt, daß die α-Kette TRO der Subgruppe III angehört.

Durch den Sequenzvergleich mit bisher bekannten anderen H-Ketten können die strukturellen Unterschiede der α-Kette erläutert werden.

Die Kette besitzt einen ausgeprägten Hinge-Bereich im Anschluß an die C1-Region und zusätzlich 18 Aminosäuren am Ende der C3-Region.

Abschließend werden die vorhandenen Sequenzdaten der H-Ketten im Sinne einer evolutionären Entstehung erläutert und eine genetische Interpretation des Hinge-Bereiches gegeben.

E Literaturverzeichnis


1.) Grey, H.M.,
Adv.Immunology, 10, 51 (1969)

2.) Humphrey, J.H. und White, R.G.,
Kurzes Lehrbuch der Immunologie G.Thieme Verlag,
Stuttgart 1971, S.53

3.) Fleischmann, J.B., Porter, R.R. und Press, E.M.,
Biochem.J., 88, 220 (1963)

4.) Edelman, G.M.und Gally, E.E.,
Proc.Nat.Acad.Sci., 51, 846 (1964)

5.) Hilschmann, N., Ponstingl, H., Watanabe, S.,
Barnikol, H.U., Baczko, K., Braun, M. und Leibold, W.,
Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft,
66.Jahresversammlung, Gustav Fischer Verlag, Frank-
furt 1973, S.280

6.) Hilschmann, N. und Craig, L.C.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 53, 1403 (1965)

7.) Haber, E.,
Ann.Rev.Biochem., 37, 497 (1968)

8.) Nisinoff, A., Hopper, J.E. und Spring, S.B.,
The Antibody Molecule, Academic Press New York 1975,
S.12

9.) Ponstingl, H., Schwarz, J., Reichel, W. und
Hilschmann, N.,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem., 351, 1591 (1970)

10.) Edelman, G.M., Cunningham, B., Gall, W.E.,
Gottlieb, P.D., Rutishauser, U. und Waxdal, M.K.J.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63, 78 (1969)

11.) Ponstingl, H. und Hilschmann, N.,
Hoppe Seyler's Z. 353, 1369 (1972)

12.) Bennich, H. und Bahr-Lindenström, H.von
in Progress in Immunologie II, (Brent, L. und
Holborow, L., Hrsg.) Bd.1 North-Holland Publ.Co.
Amsterdam (1974)

13.) Watanabe, S., Barnikol, H.U., Horn, J., Bertram,
J. und Hilschmann, N.,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 1505 (1973)

14.) Capra, D.J. und Kehoe, J.M.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 845 (1974)

15.) Kratzin, H., Altevogt, P., Ruban, E., Kortt, A.,
Staroscik, C. und Hilschmann, N.,
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1337 (1975)

16.) Putnam, F.W., Low, T., Liu, V., Huser, H.,
Raff, E., Wong, F.C. und Clamp, J.R.,
Adv.Exp.Med.Biol. 45, 177 (1974)

17.) Chuang, C.Y., Capra, J.D. und Kehoe, M.,
Nature (London), 244, 158 (1973)

18.) Mendez, E., Frangione, B. und Franklin, E.C.,
Biochem., 12, 5186 (1973)

19.) Wolfenstein, C., Frangione, B., Mihaesco,E und
Franklin, E.C.,
Biochem., 10, 4140 (1971)

20.) Wolfenstein-Todel, C., Prelli, F., Frangione, B.
und Franklin, E.C.,
Biochem. 12, 5195 (1973)

21.) Low, T.L.K., Liu, Y.S.V und Putnam, F.W.,
Science 191, 390 (1976)

22.) Tomasi, T.B., Tan, E.M., Solomon, A. und
Pendergast, R.A.,
J.Exp.Med., 121, 101 (1965)

23.) Tomasi, T.B. und Grey, H.M.,
in Progr.in Allergy, Vol.16, 81-213,
Verlag Karger, Basel 1972

24.) Morrison, S.L. und Koshland, M.E.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 124 (1972)

25.) Abel, C.A. und Grey, H.M.,
Nature 233, 29 (1971)

26.) Kratzin, H., Kortt, A. und Hilschmann, N.,
in Vorbereitung

27.) Ruban, E. und Hilschmann, N.,
in Vorbereitung

28.) Maurer, H.,
Diskelektrophorese, Verlag Walter de Gruyter
und Co. Berlin 1968

29.) Anfinsen, C.B. und Haber, E.,
J.Biol.Chem. 236, 1361 (1961)

30.) Raftery, M.A. und Cole, R.D.,
J.Biol.Chem. 241, 3457 (1966)

31.) Moore, S. und Stein, W.H.,
J.Biol.Chem. 211, 907 (1954)

32.) Needleman, S.B.,
Protein Sequence Determination,
Verlag Springer, Berlin, Heidelberg,
New York 1970, S.175

33.) Partridge, S.M.,
Biochem.J. 42, 238 (1948)

34.) Consden, R., Gordon, A.H. und Martin, A.J.P.,
Biochem.J. 38, 224 (1944)

35.) Archer, R. und Crocker, C.,
Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 9, 704 (1952)

36.) Jepson, J.B. und Smith, I.,
Nature 172, 1100 (1953)

37.) Sanger, F. und Tuppy, H.,
Biochem.J. 49, 463 (1951)

38.) Smith, I.,
Nature (London) 171, 43 (1953)

39.) Toennies, G. und Kolb, J.J.,
Analytic.Chem. 23, 823 (1951)

40.) Porn, S.C. und Butcher, J.T.,
Anal.Chem., 38, 836 (1956)

41.) Matsubara, H. und Sasaki, R.,
Biochem.biophys.Res.Commun. 35, 175 (1969)

42.) Wittmann-Liebold, B. und Wittmann, H.G.,
Biochim.biophys.Acta 251, 44 (1971)

43.) Gray, W.R.,
in Meths.Enzymol. 11, 139-151, 469-475, (1967)

44.) Woods, K.K. und Wang, K.T.,
Biochim.biophys.Acta 133, 369 (1967)

45.) Blombäck, B., Blombäck, M., Edman, P. und
Hessel, B.,
Biochim.biophys.Acta 115, 371 (1966)

46.) Edman, P. und Sjöquist, J.,
Acta Chem.Scand. 10, 1507 (1966)

47.) Brenner, M., Niederwieser, A. und
Patacki, G.,
Experienta, 17, 145 (1961)

48.) Doolittle, R.F.,
Proc.Nat.Acad.Sci. 55, 1195 (1966)

49.) Guidotti, G.,
Biochim.biophys.Acta 42, 177 (1960)

50.) Akabori, S., Ohno, K. und Marita,K.,
Bull.Chem.Soc.Japan 25, 214 (1952)

51.) Braunitzer, G.,
Chem.Ber. 88, 2025 (1956)

52.) Pfleiderer, G., Celliers, G., Stanulovic,M.
Wachsmuth, H., Determann, H. und Braunitzer,G.,
Biochem.Z. 340, 552 (1964)

53.) Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V.,
J.Biochem.biophys.Res.Commun. 28, 815 (1967)

54.) Weber, K. und Osborn, M.,
J.Biol.Chem. 244, 4406 (1969)

55.) Grey, H.M., Abel, C.A. und Zimmermann, B.,
in Annals.of the N.Y.Acad.of Science, Vol.190,
37 (1971) (Hrsg. Kunkel, H.G., Kochwa, S.)

56.) Scholz, R. und Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.356, 1333 (1975)

57.) Hilschmann, N., Kratzin, H., Altevogt, P.,
Ruban, E., Kortt, A., Staroscik, C., Scholz, R.,
Palm, W., Barnikol, H.U., Barnikol-Watanabe, S.,
Bertram, J., Horn, J., Engelhard, M., Schneider, M.
und Dreker, L.,
Wenner Gren-Foundation for Anthropological Research
Burg-Wartenstein-Symposium Nr. 65, Plenum Press
New York (im Druck)

58.) Röttgen, T. und Hilschmann, N.,
in Vorbereitung

59.) Wu, T.T. und Kabat, E.,
Exp.Med. 132, 211 (1970)

60.) Braun, M., Leibold, W., Barnikol, H.U. und Hilschmann, N., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1284 (1972)

61.) Kabat, E.A., Structural concepts in immunology and immunochemistry, New York, 1968

62.) Goetzl, E.J. und Metzger, H., Biochem. 9, 1269 (1970)

63.) Franek, F., Eur.J.Biochem. 19, 176 (1971)

64.) Haimovich, J., Eisen, H.N., Hurwitz, E. und Givol, D., Biochem. 11, 2389 (1972)

65.) Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avey, H.P., Chen, B.L., Phizackerley, R.P. und Saul, E., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 3303 (1973)

66.) Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R. und Edmundson, A.B., Biochem. 12, 4620 (1973)

67.) Epp, O., Coleman, P., Fehlhammer, H., Bode, W., Schiffer, M., Huber, R. und Palm, W., Eur.J.Biochem. 45, 513 (1974)

68.) Köhler, H., Shimizu, A., Paul, C., Moore, V. und Putnam, F.W., Nature (London) 227, 1318 (1970)

69.) Kaplan, A.P., Hood, L.E., Terry, W.D. und Metzger, H., Immunochem. 8, 801 (1971)

70.) Capra, J.D., Nature New Biol. 230, 62 (1971)

71.) Kehoe, J.M. und Capra, J.D. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68, 2019 (1971)

72.) Wang, A.C., Fudenberg, H.H. und Pink, J.R.L., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68, 1143 (1971)

73.) Capra, J.D., Wassermann, R.L. und Kehoe, J.M., J.Exp.Med. 138, 410 (1973)

74.) Dreker, L.,
Dissertation Universität Göttingen 1974

75.) Langer, B., Steinmetz-Kayne, M. und
Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Phys.Chem. 349, 945 (1968)

76.) Ponstigl, H., Hess, M. und Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 349, 867 (1968)

77.) Baczko, K., Braun, D.G., Hess, M. und
Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 763 (1970)

78.) Hilschmann, N., Barnikol, H.U., Hess, M.,
Langer, B., Ponstingl, H., Steinmetz-Kayne, M.,
Suter, L und Watanabe, S.,
FEBS-Proceedings, Academic Press, London,
New York, 15, 57-74 (1969)

79.) Milstein, C.,
Nature 216, 330 (1967)

80.) Schneider, M. und Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 1164 (1974)

81.) Watanabe, S. und Hilschmann, N.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351, 1291 (1971)

82.) Schiechl, H. und Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 111 (1971)

83.) Braun, M., Leibold, W., Barnikol, H.U. und
Hilschmann, N.,
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 647 (1971)

84.) Szilard, L.,
Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 46, 293 (1960)

85.) Dreyer, W.J., Bennett, J.C.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 54, 864 (1965)

86.) Garver, F.A. und Hilschmann, N.
FEBS-Lett. 16, 128 (1971)

87.) Fitsch, W.M.,
J.Mol.Biol. 16, 17 (1966)

88.) Fitsch, W.M. und Margiolash, E.
Science 155, 279 (1967)

89.) Britten, R.J. und Kohne, D.E.,
Science 161, 529 (1968)

90.) Storb, U.,
J.Immunol. 108, 755 (1972)

91.) Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S. und
Bernhardini, A.,
Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 71, 4027 (1974)

92.) Köhler, H., Shimizu, A., Paul, C., Moore,V.
und Putnam, F.W.,
Nature, 227, 1318 (1970)

93.) Wang, A.C., Wilson, S.K., Hopper, J.E.,
Fudenberg, H.H. und Nisonoff, A.,
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 337 (1970)

94.) Fair, D.S., Sledge, C., Krueger, R.G.,
Mann, K.G. und Hood, L.E.,
Biochem. 14, 5561 (1975)

95.) Yang, Ch.Y. und Hilschmann, N.,
in Vorbereitung

96.) Singer, S.J. und Doolittle, R.F.,
Science 153, 13 (1966)

97.) Hill, R.L., Delaney, R., Fellows, R.E. und
Lebovitz, H.E.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 56, 1765 (1966)

98.) Milstein, C.,
Nature, 209, 370 (1966)

99.) Hess, M., Hilschmann, N., Rivat, L., Rival, C.
und Ropatz, C.,
Nature New Biol. 234, 58 (1971)

100.) Wolfenstein-Todel, C., Frangione, B. und
Franklin,E.C.,
Biochem. 11, 3971 (1972)

101.) Monod, J., Jacob,F., Gros,F.,
Biochemical Society Symposium Nr.21, S. 104
Cambridge University Press, London 1962

102.) Elgin, S.C.R. und Weintraub, M.,
Ann.Rev.Biochem., 44, 726 (1975)

103.) Fleischman, J.B.
Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol.
32, 233 (1967)

104.) Knopf, P.M., Parkhouse, R.M.E. und
Lennox , E.S.,
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 58, 2288 (1967)

105.) Petris, S.de
Biochem.J. 118, 385 (1970)

106.) Brownlee, G.G., Cartwright, E.M., Cowan, N.J.,
Jarvis, J.M. und Milstein , C.,
Nature New Biol. 244, 236 (1973)

107.) Green, M., Zehavi-Willner, T., Graves, P.N.,
McInnes, J. und Pestka, S.,
Archives of Biochem. and Biophysics 172, 74 (1976)

108.) Natwig, J.B. und Kunkel, H.G.,
Adv.Immunol. 16, 1 (1973)

109.) Hilschmann, N., Watanabe, W., Barnikol, H.U.,
Laure, C.J., Bertram, J., Horn, J., Engelhard, M.,
Schneider, M. und Dreker, L.,
Nova Acta Leopoldina 42, 189 (1975)

# LEBENSLAUF

Am 16. Dezember 1947 wurde ich als erstes Kind des Polizeibeamten Friedrich Altevogt und seiner Ehefrau Ursula, geb. Jütting, in Dissen /TW geboren.

Nach der Einschulung 1954 besuchte ich Volks- und Realschule in Osnabrück und wechselte 1964 an das dortige Graf-Stauffenberg-Gymnasium über. Im Anschluß an die Reifeprüfung im Juni 1967 absolvierte ich bis zum Herbst 1968 meine Wehrpflicht bei der Bundeswehr. Zum Wintersemester 1968 nahm ich an der Technischen Universität Clausthal das Studium der Chemie auf.

Das Vordiplom legte ich im Herbst 1970 ab und begann anschließend im November 1971 meine Diplomarbeit bei K.-D. Gundermann mit dem Thema "Konfigurationsbestimmung von cis- und trans- 1.2-Dithio-1.2-dicyancyclobutan". Anfang 1973 schloß ich mein Studium mit der Diplomprüfung für Chemiker ab.

Im Mai 1973 begann ich am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin unter Anleitung von Prof. N. Hilschmann mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation.